



# Héparanes sulfate : Structure, fonctions, régulation

Romain R Vivès

## ► To cite this version:

Romain R Vivès. Héparanes sulfate : Structure, fonctions, régulation. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Grenoble, 2011. tel-01063291

**HAL Id: tel-01063291**

**<https://theses.hal.science/tel-01063291>**

Submitted on 15 Sep 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MEMOIRE**

Présenté par

**Romain Vivès**

En vue de l'obtention de l'

**HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES**

Le 27 avril 2011

# **Héparanes sulfate : Structure, fonctions, régulation**

**Composition du jury :**

*Président :* Dr Anne Imberty, (CERMAV, Grenoble)

*Rapporteurs :* Dr Dulcé Papy-Garcia (Université Paris XII)  
Dr Jacob van den Born (University of Groningen, the Netherlands)  
Dr Sylvie Fournel-Gigleux (Université de Nancy)

*Examineur :* Dr Hugues Lortat-Jacob (IBS, Grenoble)

Structure et Activité des Glycosaminoglycanes  
Institut de Biologie Structurale, UMR 5075  
41, rue Horowitz 38027 Grenoble cedex



## **REMERCIEMENTS**

Quinze années passées à étudier les GAGs, quinze années durant lesquelles j'ai beaucoup cherché, un peu trouvé, mais surtout énormément appris. Lorsqu'on se décide à passer son diplôme d'HDR, la perspective de rédiger une nouvelle thèse semble un peu fastidieuse. Mais cela reste une opportunité des plus précieuses de faire un état des lieux des avancées du domaine et d'y replacer ses propres contributions. Cela reste une opportunité de prendre un peu de recul, de faire un bilan sur son parcours, ses choix, les occasions qui se sont présentées et qui ont été saisies... ou pas. Et cela reste une opportunité de regarder vers l'avant et d'envisager de nouvelles perspectives, d'explorer de nouvelles pistes, de prendre de nouveaux départs.

Je tiens tout d'abord à remercier John Gallagher et Hugues Lortat-Jacob, mes deux mentors, qui m'ont tout appris et à qui je dois tant. Merci de m'avoir transmis votre passion et votre enthousiasme, de m'avoir appris la patience et la rigueur, et même si parfois nous avons pu avoir des divergences d'opinion, merci pour votre soutien et votre confiance.

Je souhaiterais remercier les membres du jury d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail : merci à Anne Imberty d'en avoir accepté la présidence, aux rapporteurs Sylvie Fournel-Gigleux, Dulcé Papy-Garcia et Jacob van den Born, et à Hugues Lortat-Jacob qui est probablement le témoin le plus proche de mon parcours professionnel.

Je voudrais également remercier mes collaborateurs, présents ou passés, qui m'ont permis de développer de nouveaux projets, qui m'ont éclairé de leurs connaissances dans leurs domaines d'expertises et avec qui j'ai pris tant de plaisir à travailler et à partager des discussions scientifiques. Merci à Anne Imberty pour cet outil formidable qu'est la modélisation moléculaire, à Eric Faudry et le groupe BBSI pour nos travaux sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, à Azadeh Zaferani et Jacob van den Born pour leur accueil à Groningen et nos collaborations présentes (et je l'espère futures), à Fabian Milz et Thomas Dierks pour leur contribution au projet Sulf, à Mohammed Ouzzine et Sylvie Fournel-Gigleux pour notre intérêt commun dans la machinerie de biosynthèse des GAGs, à Fernando Arenzana-Seisdedos, David Bonaffé et Quentin Sattentau pour notre collaboration sur le projet HIV, à Véronique Rossi, Christine Gaboriaud et les membres du RIPSa pour les travaux sur les

protéines de l'immunité innée, à Eric Chabrol et Franck Fieschi pour m'avoir fait partager leur « passion » pour la Langérine et son fameux Granule de Birbeck, à Pascal Fender pour les cafés pris ensemble à essayer de comprendre à quoi sert le dodécaèdre de l'adénovirus, et enfin à Jean-Pierre Andrieu pour son infini patience, ses connaissances de Lightroom et du principe de l'hyperfocale, et ses analyses N-ter dans le cadre de la technique des « billes ».

Merci également à tous mes collègues, à ceux qui partagent mon quotidien et me supportent tous les jours au laboratoire : Bridget, Cédric, Els, Julia, Rabia, les nouveaux arrivants Célia, Mathieu et Sébastien et nos voisins du LEM « canal historique ». Pour beaucoup d'entre eux, ces collègues sont devenus des amis, et je voudrais donc les remercier également à ce titre, ainsi que Pascal, mon complice de toujours, et Mylène, pour sa joie de vivre et sa blonditude (formule reprise, mais tellement juste...). Merci également à tous les autres, que j'ai croisé hors de mon parcours professionnel et qui, même si je ne pourrais pas les citer un par un, comptent tout autant. Je souhaiterais enfin associer à ces remerciements ma famille, ma maman, ma compagne, mes enfants, pour leur patience et leur soutien indéfectible.

Pour finir, plus que des remerciements, je souhaiterais dédier ce manuscrit à tous les étudiants dont j'ai encadré le travail et qui ont contribué, chacun à leur niveau, à faire avancer mes recherches. Elodie et Emilie, avec qui j'ai passé le plus de temps, mais également Léa, Florian, Tiffany, Julie, Elodie (2), Julien, Sarah, Géraldine, Audray, Clothilde, Estelle et Narinder. Merci pour votre confiance, votre patience, merci pour la complicité et même pour l'amitié que j'ai gardé avec beaucoup d'entre vous, et enfin merci de m'avoir fait découvrir, petit à petit, un des aspects les plus enrichissants du métier de chercheur : la transmission de la connaissance.

# Sommaire

<b>LISTE DES TABLES ET FIGURES .....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>1 INTRODUCTION A LA THEMATIQUE DE RECHERCHE : LES GLYCOSAMINOGLYCANES, LEUR STRUCTURE, LEURS FONCTIONS .....</b>	<b>- 10 -</b>
1.1 LES PROTEOGLYCANES .....	- 11 -
1.1.1 Les PGs matriciels .....	- 11 -
1.1.2 Les PGs membranaires .....	- 13 -
1.1.3 PG intracellulaire : la Serglycine .....	- 16 -
1.1.4 Les PGs circulants .....	- 17 -
1.2 LES GLYCOSAMINOGLYCANES .....	- 18 -
1.3 HEPARINE ET HS .....	- 20 -
1.3.1 Structure des HS .....	- 20 -
1.3.2 Biosynthèse des HS .....	- 22 -
1.3.3 Le catabolisme des HS .....	- 27 -
1.4 INTERACTION HS/PROTEINES .....	- 32 -
1.4.1 Rôle fonctionnel .....	- 32 -
1.4.2 Aspects structuraux des interactions HS/protéines .....	- 39 -
1.4.3 Dynamique de l'interaction .....	- 41 -
<b>2 LE PASSE : ROLE DES HS DANS LA PROMOTION DE LA REPONSE AU FGF-2 .....</b>	<b>- 43 -</b>
2.1 INTERACTION FGF-2/HS : ETAT DE L'ART EN 1996 .....	- 43 -
2.2 PREPARATION, CARACTERISATION STRUCTURALE ET CRIBLAGE FONCTIONNEL DE BANQUES D'OLIGOSACCHARIDES D'HS .....	- 45 -
2.2.1 Génération d'une banque d'oligosaccharides d'HS .....	- 45 -
2.2.2 Propriétés fonctionnelles des oligosaccharides d'HS vis-à-vis du FGF-2 .....	- 48 -
2.2.3 Analyse disaccharidique des oligosaccharides d'HS .....	- 51 -
2.2.4 Préparation d'une deuxième banque de décasaccharides d'HS .....	- 53 -
2.3 DISCUSSION : QU'AVONS-NOUS APPRIS ? .....	- 55 -
2.3.1 Impact de ces travaux .....	- 55 -
2.3.2 Quels progrès depuis ? .....	- 57 -
<b>3 LE PRESENT : ROLE DES GAGS DANS LES RELATIONS HOTE-PATHOGENES ET LES PROCESSUS INFLAMMATOIRES .....</b>	<b>- 60 -</b>
3.1 ROLE DES HS AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH .....	- 61 -
3.1.1 Etude de l'interaction gp120/HS par résonance plasmonique de surface .....	- 62 -
3.1.2 Caractérisation des domaines d'interaction aux HS sur gp120 .....	- 68 -
3.1.3 Conclusion et perspectives .....	- 76 -
3.2 ROLES DES HS DANS LA FIXATION ET L'ENTREE DES DODECAEDRES DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 3 .....	- 76 -
3.3 ROLE DES GAGS DANS LES PROCESSUS INFLAMMATOIRES : INTERACTION RANTES/HS .....	- 80 -
<b>4 UNE NECESSITE PERMANENTE : LES DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES .....</b>	<b>- 86 -</b>
4.1 SÉQUENÇAGE D'OLIGOSACCHARIDES : LE « TRITIUM END LABELLING SEQUENCING » (TELS) .....	- 86 -
4.2 PURIFICATION D'OLIGOSACCHARIDES PAR PAGE .....	- 88 -

4.3	IDENTIFICATION DES DOMAINES D'INTERACTION AUX HS SUR LES PROTEINES : LA TECHNIQUE DES « BILLES ».....	- 91 -
<b>5</b>	<b>LE FUTUR : MECANISMES DE REGULATION DE L'EXPRESSION ET DE LA STRUCTURE DES HS ET LEURS CONSEQUENCES FONCTIONNELLES.....</b>	<b>- 94 -</b>
5.1	ROLE DES HS DANS LES MECANISMES DE VIRULENCE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA .....	- 95 -
5.1.1	<i>Rôle des HS au cours de l'infection par P. aeruginosa.....</i>	<i>- 98 -</i>
5.1.2	<i>Analyse de l'interaction des HS avec les protéines du SST3.....</i>	<i>- 99 -</i>
5.1.3	<i>Expression et structure des HS au cours de la différenciation des cellules HL-60.....</i>	<i>- 101 -</i>
5.1.4	<i>Conclusion et perspectives .....</i>	<i>- 104 -</i>
5.2	CARACTERISATION STRUCTURALE DES GLYCOSAMINOGLYCANES DU DERME HUMAIN .....	- 105 -
5.2.1	<i>Approche biochimique : purification et caractérisation des GAGs à partir d'un modèle de derme reconstitué.....</i>	<i>- 106 -</i>
5.2.2	<i>Approche transcriptionnelle : étude de l'expression des protéoglycanes et des enzymes de la biosynthèse des GAGs.....</i>	<i>- 108 -</i>
5.2.3	<i>Conclusion et perspectives .....</i>	<i>- 109 -</i>
5.3	ETUDE DE L'ENZYME HSULF ET DE SES EFFETS SUR LA STRUCTURE DES HS CELLULAIRES .....	- 110 -
5.3.1	<i>Mise en place d'un système d'expression de HSulf-2 en cellules HEK.....</i>	<i>- 111 -</i>
5.3.2	<i>Etude de l'activité enzymatique de HSulf-2.....</i>	<i>- 112 -</i>
5.3.3	<i>Conclusion et perspectives .....</i>	<i>- 114 -</i>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>- 116 -</b>
	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>- 119 -</b>
	<b>ACTIVITES D'ENCADREMENT.....</b>	<b>- 123 -</b>
	<b>ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT .....</b>	<b>- 125 -</b>
	<b>DIFFUSION DE LA CULTURE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>- 126 -</b>
	<b>TRANSFERT TECHNOLOGIQUE, RELATIONS INDUSTRIELLES ET VALORISATION .....</b>	<b>- 127 -</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>- 129 -</b>

## ***LISTE DES TABLES ET FIGURES***

### **FIGURES**

FIGURE 1 : LA FAMILLE DES GLYCOSAMINOGLYCANS (GAGs)	- 18 -
FIGURE 2 : STRUCTURE DES HEPARANES SULFATE	- 21 -
FIGURE 3 : BIOSYNTHESE DES GAGs : FORMATION DU TETRASACCHARIDE « LINKER »	- 23 -
FIGURE 4 : BIOSYNTHESE DES GAGs : ELONGATION ET MATURATION DE LA CHAÎNE SACCHARIDIQUE	- 25 -
FIGURE 5 : ORGANISATION EN DOMAINES DES SULFS	- 30 -
FIGURE 6 : MOTIF PENTASACCHARIDIQUE DE FIXATION A L'AT-III	- 34 -
FIGURE 7 : STRUCTURE DU COMPLEXE IFN $\gamma$ /HS	- 36 -
FIGURE 8 : ANALYSE PAR SPR DES DYNAMIQUES D'INTERACTION DES HS AVEC DES PROTEINES D'ENVELOPPE VIRALES OU DES CYTOKINES/CHIMIOKINES	- 42 -
FIGURE 9 : MODELES HYPOTHETIQUES D'ACTIVATION DU FGF-2 PAR LES HS	- 44 -
FIGURE 10 : GENERATION D'UNE BANQUE D'OLIGOSACCHARIDES D'HS : SEPARATION PAR LA TAILLE	- 46 -
FIGURE 11 : GENERATION D'UNE BANQUE D'OLIGOSACCHARIDES D'HS : SEPARATION PAR LA CHARGE	- 47 -
FIGURE 12 : INDUCTION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES BAF-32 PAR LE FGF-2 ET LES HS	- 49 -
FIGURE 13 : ACTIVATION DU FGF-2 PAR LES OLIGOSACCHARIDES RIIdp10s ET RIIdp12s	- 50 -
FIGURE 14 : MODELE STRUCTURAL DES OLIGOSACCHARIDES DE LA BANQUE D'HS	- 51 -
FIGURE 15 : RELATIONS STRUCTURE/FONCTION : CORRELATION ENTRE SULFATATION ET CAPACITE D'ACTIVATION DU FGF-2	- 52 -
FIGURE 16 : PURIFICATION PAR SAX-HPLC DES OLIGOSACCHARIDES RIIdp10s	- 53 -
FIGURE 17 : ACTIVATION DU FGF-2 PAR LES OLIGOSACCHARIDES RIIdp10Bs ET -Es	- 54 -
FIGURE 18 : ANALYSE EN BIACORE DE L'INTERACTION DE GP120 SUR UNE SURFACE D'HEPARINE	- 63 -
FIGURE 19 : ANALYSE EN BIACORE DE L'ADSORPTION DE VIRUS X4 ET R5 SUR UNE SURFACE D'HEPARINE	- 64 -
FIGURE 20 : MISE EN EVIDENCE DE L'INTERACTION HS/CD4i	- 65 -
FIGURE 21 : ETUDE DU COMPLEXE GP120/HEPARINE PAR MODELISATION MOLECULAIRE	- 66 -
FIGURE 22 : INHIBITION DE L'INTERACTION DE COMPLEXES GP120/CD4 SUR UNE SURFACE D'ANTICORPS 17B PAR DES OLIGOSACCHARIDES D'HEPARINE	- 66 -
FIGURE 23 : CONCEPT DE LA MOLECULE HYBRIDE CD4-HS BREVETEE	- 67 -
FIGURE 24 : EXPRESSION ET PURIFICATION DE GP120 EN CELLULES Sf21/BACULOVIRUS	- 68 -
FIGURE 25 : TESTS DE FONCTIONNALITE (BIACORE) DE LA PROTEINE GP120 PRODUITE AU LABORATOIRE	- 69 -
FIGURE 26 : IDENTIFICATION DES DOMAINES D'INTERACTION AUX HS DE GP120	- 71 -
FIGURE 27 : DOMAINES D'INTERACTION AUX HS SUR GP120	- 72 -
FIGURE 28 : TESTS DE FONCTIONNALITE DES DIFFERENTS MUTANTS DE GP120	- 73 -
FIGURE 29 : INTERACTION DES MUTANTS DE GP120 AVEC L'HEPARINE	- 75 -
FIGURE 30 : LE DODECAEDRE DE L'Ad3	- 77 -
FIGURE 31 : LES HS PERMETTENT L'ATTACHEMENT ET L'ENTREE DES DDS DANS DES CELLULES NON PERMISSIVES POUR L'Ad3	- 77 -
FIGURE 32 : ANALYSE DE L'INTERACTION Dd/HEPARINE EN BIACORE	- 78 -
FIGURE 33 : ROLE DES HS DANS L'ENTREE DES DDS DANS DES CELLULES PERMISSIVES POUR L'Ad3	- 79 -
FIGURE 34 : ANALYSE DE L'INTERACTION RANTES(9-68)/HEPARINE EN BIACORE	- 82 -
FIGURE 35 : INTERACTION RANTES(9-68)/HS : INFLUENCE DE LA TAILLE DU MOTIF OLIGOSACCHARIDIQUE	- 83 -
FIGURE 36 : STECHIOMETRIE D'UN COMPLEXE RANTES(9-68)/OLIGOSACCHARIDE STABILISE PAR COUPLAGE COVALENT	- 83 -
FIGURE 37 : MODELISATION DE L'INTERACTION ENTRE UN DIMERE DE RANTES ET UN HEXADECASACCHARIDE D'HEPARINE	- 84 -
FIGURE 38 : INHIBITION DE LA FIXATION DE RANTES(9-68) ET SDF-1 $\alpha$ SUR UNE SURFACE D'HEPARINE PAR LES OLIGOSACCHARIDES COUPLES « TETE-BECHE »	- 85 -
FIGURE 39 : EXEMPLE DE SEQUENÇAGE D'UN HEXASACCHARIDE D'HS (RIIdp6B) PAR LE TELS	- 87 -
FIGURE 40 : ANALYSE DE LA PURETE DES RIIdp10s	- 89 -
FIGURE 41 : ANALYSE ET PURIFICATION D'OLIGOSACCHARIDES D'HS SUR GEL D'ACRYLAMIDE	- 90 -
FIGURE 42 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DES « BILLES » POUR L'IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES IMPLIQUES DANS LA FIXATION AUX HS	- 92 -



FIGURE 43 : STRUCTURE DU SST3 DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	- 96 -
FIGURE 44 : IMPLICATION DES HS DANS L'ACTIVITE DU SST3 DE <i>P. AERUGINOSA</i>	- 99 -
FIGURE 45 : ANALYSE DE L'INTERACTION DES HS AVEC LES PROTEINES DU SST3	- 100 -
FIGURE 46 : ANALYSE DE LA DYNAMIQUE ET DE LA SPECIFICITE DE L'INTERACTION POPD/HS EN BIACORE	- 101 -
FIGURE 47 : GAMME ETALON REALISEE POUR LE GENE DE LA GAPDH, UTILISE COMME GENE DE MENAGE	- 102 -
FIGURE 48 : EXPRESSION DES SYNDECANS AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DES HL-60	- 103 -
FIGURE 49 : ANALYSE EN FACS DE L'EXPRESSION DES SYNDECAN-1 ET -4 A LA SURFACE DES HL-60 NON DIFFERENCIEES, OU DIFFERENCIEES A LA VITAMINE D3	- 104 -
FIGURE 50 : NATURE ET PROPORTIONS DES CHAINES DE GAGS ISOLEES A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE	- 108 -
FIGURE 51 : TEST D'ACTIVITE ARYL SULFATASE	- 111 -
FIGURE 52 : ANALYSE DISACCHARIDIQUE D'HS, AVANT OU APRES TRAITEMENT PAR HSULF-2	- 112 -
FIGURE 53 : ANALYSE PAR RMN DE L'OCTASACCHARIDE H8 TRAITE PAR HSULF-2	- 113 -
FIGURE 54 : STRATEGIE D'ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES HSULFS	- 114 -

## **TABLES**

TABLE 1 : LES PROTEOGLYCANES MATRICIELS	- 12 -
TABLE 2 : GENERATION DES MOTIFS 3-O-SULFATES DE FIXATION DE L'AT-III OU D'ENTREE DE L'HSV-1 PAR LES DIFFERENTES ISOFORMES DE 3OSTs	- 27 -
TABLE 3 : EXEMPLES DE PROTEINES FIXANT LES HS	- 33 -
TABLE 4 : QUANTIFICATION DES PGs PURIFIES A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE (EN CPM)	- 107 -
TABLE 5 : QUANTIFICATION DES PGs PURIFIES A PARTIR DES DERMES RECONSTITUES (EN CPM)	- 107 -

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

2O/3O/6OST	2-O-/3-O-/6-O-sulfotransférase
6Sase	Glucosamine-6-sulfatase
AT-III	Antithrombine III
CD4i	CD4 induit
Cpm	Coups par minute
CS	Chondroïtine sulfate
Dd	dodécaèdre
$\Delta$ hexA	Acide hexuronique $\Delta$ 4-5 insaturé
Dp	degré de polymérisation
DS	Dermatane sulfate
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FGly	N-Formyl Glycine
GAG	Glycosaminoglycane
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetyl galactosamine
GlcA	Acide glucuronique
GlcNAc	N-acetyl glucosamine
GlcNS	N-sulpho glucosamine
Gp	Glycoprotéine
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol
HA	Acide hylaluronique
HexA	Acide hexuronique
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Héparane sulfate
HSPG	Protéoglycane à héparane sulfate
I2Sase	Iduronate-2-sulfatase
IdoA	Acide iduronique
IdoAse	Iduronidase
kDa	Kilo Dalton
KS	Kératane sulfate
NDST	N-déacétylase/N-sulfotransférase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAPS	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate
PG	Protéoglycane
pHNO <sub>2</sub>	Traitement partiel à l'acide nitreux
Rantes	Regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted
SAX	Strong-anion-exchange
SDF	Stromal derived factor
TELS	Tritium end-labelling sequencing
Xyl	Xylose

# **1 INTRODUCTION A LA THEMATIQUE DE RECHERCHE : LES GLYCOSAMINOGLYCANES, LEUR STRUCTURE, LEURS FONCTIONS**

## **Un peu d'histoire....**

Comme la plupart des grandes avancées scientifiques, la découverte de l'héparine est le fruit du hasard et d'une certaine ironie du destin. En effet, l'histoire de cette molécule, référence mondiale en matière d'agent anticoagulant, débute en 1916, lorsque Jay McLean, un jeune étudiant en médecine, parvient à isoler à partir de foie une fraction présentant une très forte activité anticoagulante, alors qu'il cherchait à identifier.... des molécules pro-coagulantes !

Ces premiers travaux lui vaudront son nom (puisque extraite du foie, « hepar » en grec) , mais il faudra attendre près de 15 ans pour que l'héparine soit enfin associée aux glycosaminoglycanes (appelés à cette époque mucopolysaccharides), une famille de polysaccharides complexes (incluant acide hyaluronique, chondroïtines sulfate, dermatanes sulfate, et kératanes sulfate) reconnus dès la fin XIXème siècle comme des constituants de base des matrices extracellulaires et des tissus conjonctifs [1]. A cette famille viendront s'ajouter un peu plus tard les héparanes sulfate [2], initialement nommés « héparine monosulfate », car considérés comme un sous-produit obtenu lors de la purification de l'héparine.

C'est durant les années 50 que naît le concept de protéoglycane. Il apparaît de plus en plus clairement que les glycosaminoglycanes sont toujours retrouvés en association avec un composant protéique, et la nature covalente de ce glycoconjugué est confirmée par Muir *et al.*, en 1958 [3]. En 1966, Roden et Smith [4] caractérisent le motif tétrasaccharidique impliqué dans l'accrochage des chaînes polysaccharidiques sur un core protéique. Au cours des années 70s, les premières données sur la structure fine des HS et de l'héparine sont obtenues, notamment grâce au développement de la RMN. Point d'orgue de l'ensemble de ces travaux, les efforts combinés de plusieurs équipes conduiront à l'identification du motif pentasaccharidique spécifique de fixation et d'activation de l'antithrombine III [5].

Enfin, les vingt dernières années ont vu se multiplier les travaux sur les GAGs, conduisant à l'identification de nouveaux ligands ou de nouvelles fonctions biologiques. Une date clé de cette période est probablement 1991, quand deux équipes mettent en évidence le rôle majeur des HSPGs en tant que corécepteur indispensable à l'activité du facteur de croissance FGF-2. Aujourd'hui, plus de 300 protéines sont connues pour interagir avec les GAGs et ces polysaccharides sont clairement identifiés comme des acteurs essentiels de la régulation de la plupart des grands processus cellulaires, physiologiques ou pathologiques.

## ***1.1 LES PROTEOGLYCANES***

Les protéoglycanes (PGs) sont des glycoprotéines ubiquitaires, trouvés dans la plupart des tissus mammifères, et caractérisés par un core protéique sur lequel sont retrouvées associées de manière covalente une ou plusieurs chaînes de GAGs. Les propriétés fonctionnelles des PGs et leur classification dépendent de la séquence polypeptidique de leur core protéique (définissant différentes sous-familles de PGs), de la nature de leurs chaînes de GAGs (HSPGs, CSPGs, DSPGs...) et de leur localisation (principalement les PGs matriciels ou de surface cellulaire).

### **1.1.1 Les PGs matriciels**

Les PGs sont l'un des constituants principaux des matrices extracellulaires. Les PGs matriciels correspondent généralement à de grosses protéines modulaires, porteuses de nombreuses chaînes de GAGs, d'HS ou de CS/DS. Plusieurs familles y sont représentées (Table 1), les principaux PGs matriciels étant :

- Le **Perlécane**, exprimé dans la membrane basale des cellules épithéliales et endothéliales, ainsi que dans le cartilage. Son core protéique de 470 kDa est constitué par 5 modules protéiques, le domaine I portant les 3 chaînes de GAGs du protéoglycane (généralement de type HS). Le Perlécane est capable d'interagir, *via* ses modules protéiques ou ses chaînes de GAGs, avec de nombreux partenaires protéiques, tels que les intégrines, les FGFs, la laminine-1, la fibronectine, le collagène IV... Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, tels que l'athérosclérose, l'angiogénèse et le

cancer [6]. Une mutation dans le domaine V du Perlécan a été associée au syndrome Schwartz-Jampel affectant les muscles et lié à la non-dégradation de l'acétylcholine [7]. Enfin, le clivage par protéolyse de la région C-terminale du Perlécan conduit à la libération de l'Endorépéline, peptide présentant des propriétés anti-angiogéniques [8].

Protéoglycane	Core protéique (Kd)	Nb de chaînes de GAGs	Distribution
Aggrécan	208–220	~100 CS/DS	Sécrété ; cartilage
Versican	265	12–15 CS/DS	Sécrété ; tissus conjonctifs ; aorte; cerveau
Neurocan	145	1–2 CS/DS	Sécrété ; cerveau
Brévican	96	0–4 CS/DS	Sécrété ; cerveau
Décorine	36	1 CS/DS	Sécrétée ; tissus conjonctifs
Biglycan	38	1–2 CS/DS	Sécrété ; tissus conjonctifs
Perlécan	400	1–3 HS	Sécrété ; membranes basales ; cartilage
Agrine	200	1–3 HS	Sécrétée ; jonctions neuromusculaires
Collagène type XVIII	147	2–3 HS	Sécrété ; membranes basales

**Table 1 : Les Protéoglycanes matriciels**

D'après [9].

- L'**Agrine** est un HSPG présentant un core protéique de 225 kDa et au moins 3 chaînes d'HS (localisées dans la région N-terminale de la protéine), conduisant à un poids moléculaire total de plus de 600 kDa. L'Agrine est un constituant abondant de la membrane basale et joue un rôle important au niveau des jonctions neuromusculaires en permettant le rassemblement des récepteurs à l'acétylcholine (AChRs) et la formation de l'appareil post-synaptique [10]. L'épissage alternatif du gène de l'Agrine conduit à la synthèse de deux isoformes, dont l'une est une protéine transmembranaire de type II (TM-agrin) et l'autre est extracellulaire. Cette différence de localisation va conférer à ces isoformes des propriétés biologiques très distinctes [11].

- Le **Versican** est une grosse protéine modulaire dont le poids moléculaire apparent peut dépasser les 1000 kDa. Les chaînes de GAGs sont retrouvées au niveau de deux régions

du domaine II, GAG- $\alpha$  et GAG- $\beta$ , présentant plus de 30 séquences consensus d'attachement des GAGs, ainsi que des sites de N- et O-glycosylation. Différentes isoformes de Versican peuvent être générées par épissage alternatif des exons codant pour ces régions, aboutissant ainsi à des variants présentant l'une ou l'autre de ces régions, les deux ou aucune. Le versican a de multiples fonctions. En interagissant avec l'acide hyaluronique (*via* son domaine D1), il intervient dans les phénomènes de rétention d'eau et de remodelage cellulaire [12]. Il agit également comme un régulateur négatif de l'adhésion cellulaire et son expression est fortement augmentée dans un grand nombre de cancers [12-13].

- l'**Aggrécan**, le plus volumineux des PGs, est le constituant majeur du cartilage. Il présente une organisation modulaire, avec en particulier un domaine II d'attachement des GAGs pouvant porter plus d'une centaine de chaînes de CS/DS [14]. Dans les cartilages, l'Aggrécan interagit avec l'acide hyaluronique et forme, en compagnie de protéines de liaisons (comme CD44 ou TSG-6), des complexes supra-moléculaires dont la taille peut atteindre plus de 200.000 kDa. Ces macro-complexes polyanioniques présentent des propriétés de rétention d'eau exceptionnelle (volume hydrodynamique mille fois supérieur à leur propre volume) et confèrent au cartilage ses caractéristiques physiques d'hydratation, d'élasticité et de résistance au stress mécanique [14-16].

- la **Décorine** est un PGs appartenant à la famille des SLRPs (Small Leucine-Rich Protein) [14], caractérisée principalement par sa chaîne de DS unique reliée à son core protéique [16]. Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques, comme la stabilisation des fibres de collagène [14], la croissance tumorale ou le contrôle de l'angiogénèse [17]. Son action ferait intervenir la régulation de facteurs de croissance, comme le TGF- $\beta$  [14, 18], mais également l'interaction avec des récepteurs de type tyrosine kinase, tels que l'EGFR, l'IGFR ou des récepteurs de type erbB [19-21].

### 1.1.2 Les PGs membranaires

Les PGs retrouvés à la surface cellulaire sont, pour la très grande majorité, des HSPGs. Deux familles principales sont représentées, les Syndécans et les Glypicans, qui se distinguent par la nature de leur core protéique et leur mode d'ancrage à la membrane.

### *1.1.2.1 Les Syndécans*

Les Syndécans sont une famille de quatre protéines distinctes, nommés Syndécan-1-4 en fonction de leur ordre de découverte. Ce sont des protéines transmembranaires de type I, constituées d'une courte séquence C-terminale intracellulaire, d'une région transmembranaire et d'un domaine extracellulaire. Ce dernier correspond à la région la plus variable de la protéine, avec seulement 10-20% de similarité de séquence entre Syndécans [22]. Cependant, certaines caractéristiques de séquences demeurent très conservées, telles qu'un cluster d'acides aminés basiques proche du domaine transmembranaire, les motifs de reconnaissance aux protéases responsables du phénomène de « shedding » des ectodomaines des Syndécans (voir paragraphe 1.3.3.3), et les séquences impliquées dans l'attachement des chaînes de GAGs (voir paragraphe 1.3.2.1). De fait, la nature, le nombre et la position des chaînes de GAGs sur les Syndécans restent invariables selon les espèces, suggérant un rôle essentiel des ectodomaines pour la présentation et la distribution des chaînes de GAGs selon un arrangement dans l'espace bien défini. Ainsi, les Syndécans-1 et -3 présentent des sites d'attachement des GAGs dans deux régions distinctes situées aux extrémités de leur ectodomaine, alors que les Syndécans-2 et -4 ne disposent que de ceux présents à l'extrémité N-terminale. Les Syndécans-1 et -4 sont des protéoglycanes hybrides à la fois porteurs de chaînes d'HS et de CS/DS. Pour le premier, l'ancrage des CS/DS se fait principalement au niveau des sites d'attachement proches de la membrane plasmique. A l'inverse, les Syndécans-2 et -3 sont des HSPGs exclusifs (pas de glycosylation de type CS/DS détectée pour ces protéoglycanes).

Contrairement à leur ectodomaine, les régions transmembranaire et cytoplasmique des Syndécans sont très homologues (60-70% d'identité de séquence) et contiennent notamment quatre résidus tyrosine strictement conservés : trois dans le domaine cytoplasmique et un situé à la jonction de ces deux régions. Le domaine cytoplasmique se caractérise par la présence de deux régions très conservées, les domaines C1 (près du domaine transmembranaire) et C2 (à proximité de l'extrémité C-terminale), séparés par une région variable V, présentant une faible homologie entre les Syndécans, mais une très bonne conservation inter-espèce. Cette région V jouerait un rôle important pour des fonctions biologiques Syndécan-spécifiques. Il a par exemple été montré que la région V du Syndécan-4 était impliquée dans la fixation de la protéine kinase C (PKC) et du phosphatidyl inositol di-phosphate (PIP2), interactions importantes lors de la participation de ce Syndécan dans la formation de complexes

d'adhésion focale [23-24]. A l'inverse, les domaines C1 et C2 seraient impliqués dans des fonctions communes aux différents Syndécans. Ainsi, le domaine C1 interagit avec des protéines de la voie de signalisation Cortactine/Src [25], et le domaine C2 présente un motif tétrapeptidique EFYA de reconnaissance aux protéines porteuses de domaines PDZ, telles que la Synténine [26] et CASK/Lin-2 [27].

Bien que les Syndécans soient retrouvés à la surface de la plupart des cellules mammifères, leur expression est fortement régulée, en fonction du tissu considéré et au cours du développement et de la morphogénèse [28-29]. Ainsi, Syndécan-1 est principalement trouvé sur les cellules épithéliales [22] et les cellules circulantes malignes, tandis que Syndécan-2 est présent sur les cellules endothéliales, les fibroblastes, et est particulièrement abondant dans le foie [22, 30-31]. Syndécan-3 est uniquement présent dans les tissus neuronaux [28, 32-33], alors que Syndécan-4 possède le spectre d'expression le plus large et est exprimé par la plupart des cellules [28, 34-35].

#### *1.1.2.2 Les Glypicans*

Les Glypicans furent initialement identifiés sur des fibroblastes pulmonaires humains [36], mais sont retrouvés dans un très grand nombre de tissus où ils sont généralement co-exprimés avec des membres de la famille des Syndécans. Les Glypicans sont des protéines très conservées (plus de 90% d'homologie entre les espèces), caractérisées par un core protéique de 63kDa entièrement extracellulaire, relié à la membrane plasmique *via* un ancrage de type glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI), présentant 14 résidus cystéine strictement conservés. Six membres ont été identifiés : Glypican-1 [36], Glypican-2 ou Cérébroglycan principalement exprimé durant le développement du système nerveux [37], Glypican-3 ou OCI-5 [38], Glypican-4 ou K-Glypican [39], Glypican-5 [40] et Glypican-6 [41-42]. Les Glypicans sont des HSPGs stricts [43-44], à l'exception du Glypican-5 également porteur de chaînes de CS/DS [45]. Bien que ces protéines ne possèdent pas de domaines transmembranaire et cytoplasmique, il a été montré que les Glypicans étaient impliqués dans la réponse cellulaire à de nombreux facteurs de croissance et morphogènes [46-47]. Par ailleurs, des modifications d'expression des Glypicans ont été observées dans différents types de tumeurs, notamment pour Glypican-3 [48-50]. Une mutation du gène de ce dernier a également été associée au syndrome de Simpson-Golabi-Behmel [51-53]. Enfin, certaines



propriétés biologiques des Glypicans pourraient s'expliquer par leur ancrage membranaire de type GPI qui permettrait leur localisation (et celle de leurs ligands) dans des microdomaines membranaires spécialisés, les « rafts » [54-56].

#### *1.1.2.3 Autres HSPGs membranaires*

En dehors des familles des Syndécans et des Glypicans, des chaînes de GAGs ont été retrouvées sur certaines protéines membranaires. C'est le cas du récepteur de type III du TGF $\beta$ , aussi appelé Bétaglycan [57-58], capable de fixer simultanément le TGF $\beta$  *via* son core protéique, et le FGF-2 *via* ses chaînes d'HS [59]. Une isoforme particulière du récepteur du FGF, FGFR2-IIIb, est également porteuse d'une chaîne d'HS qui lui permettrait d'accroître son affinité pour son ligand [60-61]. Enfin, des chaînes d'HS sont présentes sur l'isoforme CD44E (ou Epican) issue de l'épissage alternatif du gène de CD44. Celle-ci, exprimée à la surface des monocytes, est impliquée dans la régulation des facteurs de croissance au cours de la réaction inflammatoire et du processus de cicatrisation [62-63].

#### **1.1.3 PG intracellulaire : la Serglycine**

La Serglycine est le seul PG intracellulaire connu à ce jour et est majoritairement retrouvée dans des vésicules de type granules de sécrétion. Elle possède le plus petit core protéique de tous les PGs identifiés (10 à 15 kDa), caractérisé par une répétition de 8 dipeptides Ser-Gly sur lesquels sont attachées les chaînes de GAGs. La Serglycine est majoritairement présente dans les mastocytes où elle porte alors des chaînes d'héparine (elle est le seul PG porteur de chaînes d'héparine) [64]. Ces chaînes d'héparine sont ainsi stockées dans les granules de sécrétion des mastocytes en complexe avec des protéases, et peuvent être relarguées lors de réactions inflammatoires [65-66]. La Serglycine a aussi été détectée, à moindre échelle, dans d'autres cellules d'origine hématopoïétique telles que les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes T cytotoxiques et les plaquettes [67]. Elle a enfin été identifiée dans les cellules endothéliales [68], les cellules acineuses pancréatiques [69] et les cellules souches embryonnaires [70]. Dans toutes ces cellules, la serglycine est porteuse de chaînes de CS. Néanmoins, certaines lignées cellulaires tumorales hématopoïétiques produisent de la Serglycine possédant un faible pourcentage de chaînes d'HS [70].

#### 1.1.4 Les PGs circulants

Dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques, des fragments de PGs matriciels ou cellulaires portant des chaînes de GAGs peuvent être libérés par protéolyse et présenter des fonctions biologiques bien précises (voir paragraphe 1.3.3.3). Il existe cependant un certain nombre de PGs strictement circulants, tels que la **Bikunine** ou l'**Endocan**.

La Bikunine est un PG plasmatique présentant des propriétés anti-inflammatoires, anti-tumorales et anti-métastatiques liées à la capacité de son unique chaîne de CS à former des complexes covalents avec des polypeptides issus de l' $\alpha$ 1-microglobuline. (appelés chaînes lourdes de type 1, 2, ou 3).

L'Endocan ou ESM-1 (pour Endothelial Cell-Specific Molecule 1) est un PG circulant produit par les cellules endothéliales [71]. Il est constitué d'un core protéique de 18 kDa riche en cystéines (18 cystéines sur 184 AA) sur lequel est attaché (au niveau du résidu S137) une chaîne unique de DS.

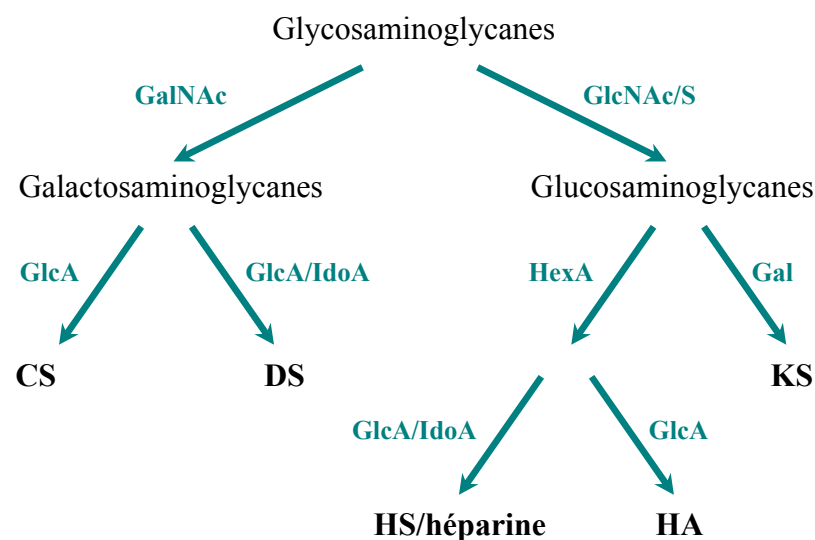
L'expression d'Endocan est intimement liée aux processus inflammatoires et au développement tumoral. Il a ainsi été montré que le taux d'Endocan circulant était fortement augmenté dans les pathologies associées à une stimulation de l'endothélium, comme les chocs septiques ou les cancers hypervascularisés tels que les cancers du poumon, du cerveau et du rein [72-75]. Des études menées sur des modèles animaux ont également montré qu'une surexpression d'Endocan augmentait la tumorigénèse [75] et qu'Endocan était un des gènes surexprimés lors de la transition du phénotype dormant au phénotype agressif et angiogénique durant le développement tumoral [76]. Plus récemment encore, Endocan a été démontré comme spécifiquement exprimé par les cellules endothéliales dites « tip cells », responsables de la néo-angiogenèse tumorale [77-78].

La chaîne unique de DS portée par Endocan est essentielle à son rôle pro-tumoral, de par sa capacité à fixer des facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le HGF/SF et le FGF-2 [79-80]. Mais il a également été montré qu'Endocan pouvait se fixer avec une forte affinité au récepteur LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) de la molécule d'adhésion ICAM-1. *In vitro*, Endocan peut se fixer aux lymphocytes *via* LFA-1 et inhiber l'interaction avec de l'ICAM-1 soluble, suggérant donc qu'il pourrait réprimer les phénomènes d'adhésion

leucocytaire dépendante de ce récepteur [81]. Dans ce sens, il a été montré *in vivo* qu'une augmentation du taux sérique d'Endocan conduisait à une réduction de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium dans un modèle d'inflammation chez le rat [82].

## 1.2 LES GLYCOSAMINOGLYCANES

Les glycosaminoglycanes sont une famille de polysaccharides complexes, linéaires et non ramifiés. Ils partagent une organisation structurale commune, basée sur la répétition d'une unité disaccharidique comprenant (exception faite des kératanes sulfate) un acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) et une hexosamine (glucosamine ou galactosamine) pouvant être variablement sulfatés. La nature des sucres formant ces unités disaccharidiques, ainsi que les types des liaisons glycosidiques impliquées, permettent de définir 6 membres de cette famille, classés en 2 sous-familles (Figure 1):



**Figure 1 : La famille des Glycosaminoglycanes (GAGs)**

GalNAc : N-acétyl galactosamine ; GlcNAc/S : N-acétyl/N-sulfo glucosamine ; HexA : acide hexuronique ; Gal: galactose ; GlcA : acide glucuronique ; IdoA : acide iduronique.

- les **galactosaminoglycanes**, qui rassemblent les **chondroïtines sulfate** (CS) et les **dermatanes sulfate** (DS), polysaccharides caractérisés par la répétition d'unités galactosamines associées à un acide glucuronique exclusivement (pour les CS) ou aux deux formes épimériques d'acides glucuronique/iduronique, dans le cas des DS.

Les CS sont les GAGs majoritairement retrouvés dans les tissus conjonctifs et tout particulièrement les cartilages, où elles jouent un rôle essentiel dans les propriétés élastiques et de résistance à la compression de ce tissu. Les CS peuvent être variablement sulfatées, la nature de ces sulfatations ayant donné lieu à une classification de ces polysaccharides. Ainsi, l'unité disaccharidique des CS peut être O-sulfatée en C-4 ou C-6 du résidu galactosamine (CS de type A et C, respectivement). Des formes plus rares, di-sulfatées (CS-D et E), ont également été retrouvées chez les requins, les calamars et certains crustacés.

Les DS ont longtemps été considérés comme une sous-classe des CS et conservent encore le nom de CS de type B. Cette ambiguïté vient du fait que les DS (caractérisés par la présence d'acide iduronique) peuvent présenter une structure de type CS (acide glucuronique) sur la très grande majorité de leur chaîne. En plus des différentes sulfatations trouvées chez les CS, l'épimérisation d'acide glucuronique en acide iduronique permet une O-sulfatation en C2 de ce dernier (la réaction d'épimérisation ayant préférentiellement lieu lorsque le résidu galactosamine associé est 4-O-sulfaté).

- Les **glucosaminoglycanes**, GAGs dont l'hexosamine est une glucosamine. Cette sous-famille comprend 3 membres, l'acide hyaluronique (HA), les héparanes sulfate (HS) et l'héparine.

L'HA est le GAG dont la structure est la plus simple, puisque sa chaîne polysaccharidique est exclusivement constituée par la répétition d'unités GlcA-GlcNAc. Il se distingue des autres GAGs car il n'est pas sulfaté, il n'est jamais retrouvé associé à un core protéique (il n'existe donc pas d'HA-PG) et il se présente sous forme de chaînes de tailles considérables (pouvant atteindre une longueur de 50000 unités disaccharidiques). L'HA est largement retrouvé dans les tissus épithéliaux et conjonctifs, l'humeur vitrée (d'où il a été initialement isolé), le liquide synovial et la peau. C'est un des constituants majeur des matrices extracellulaires, où il joue un rôle essentiel dans le maintien de l'hydratation, et est impliqué dans un certain nombre de processus physiologiques et pathologiques (adhésion cellulaire, migration, croissance tumorale...), notamment de par son interaction avec son récepteur cellulaire CD44 [83-84].

L'héparine et les HS sont les GAGs présentant le plus haut degré de sulfatation et de complexité structurale. Depuis leur découverte, ces polysaccharides ont fait l'objet d'études intensives, du fait de leur vaste répertoire d'activités biologiques et des immenses applications thérapeutiques de l'héparine comme agent anticoagulant. Leurs propriétés structurales et fonctionnelles sont décrites en détail ci-après (voir paragraphe 1.3).

#### - Les **kératanes sulfate**

Les KS se distinguent de tout autre GAGs par le fait que leur unité disaccharidique est constituée d'une glucosamine associée à un résidu glucose (à la place d'un acide hexuronique), ces deux sucres pouvant être O-sulfatés en C-6. Il existe 3 types de KS : les KS-I, II et III, principalement retrouvés dans les cartilages, la cornée (KS-I) et les os (KS-II). Ces KS se différencient principalement par leur mode d'ancrage aux cores protéiques : les KS-I correspondent à des N-glycosylations, et s'attachent sur la protéine au niveau d'asparagines, alors que les KS-II et KS-III sont retrouvés fixés sur des sérines ou des thréonines (O-glycosylations). Une des spécificités des KS-III est que la liaison sucre-protéine se fait *via* l'intermédiaire d'un résidu mannose.

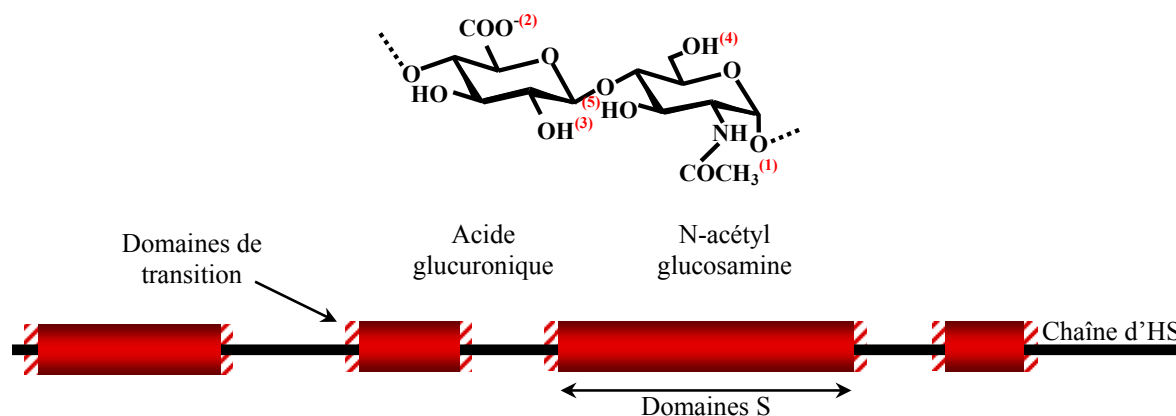
Enfin, une dernière particularité des KS est la présence de ramifications sur la chaîne polysaccharidique. Ainsi, certaines glucosamines peuvent être fucosylées, et de l'acide sialique est fréquemment retrouvé à l'extrémité des chaînes des KS (phénomène dit de « capping »).

### **1.3 HEPARINE ET HS**

#### **1.3.1 Structure des HS**

L'héparine et les HS possèdent une organisation structurale commune (Figure 2). Ils sont tous deux composés par la répétition d'une unité disaccharidique comprenant une glucosamine associée soit à un acide glucuronique, soit à un acide iduronique, et se caractérisent par un degré de sulfatation très élevé. En effet, le résidu glucosamine peut être soit N-acétylé, soit N-sulfaté, soit plus rarement présenter un groupement amine non-substitué. Par ailleurs, des O-sulfatations peuvent prendre place en C-2 de l'acide uronique, en C-6 de la glucosamine, et

plus rarement en C-3 de ce même résidu. Combinées entres elles, l'ensemble de ces modifications (épimérisation, N- et O-sulfatation) permet de générer 48 motifs disaccharidiques différents et conduit donc à un niveau de diversité considérable le long de la chaîne saccharidique.



**Figure 2 : Structure des héparanes sulfate**

Les chaînes d'HS se caractérisent par une succession de disaccharides de type acide glucuronique – N-acétyl glucosamine (GlcNAc). Les modifications de ce motif de base portent sur la N-déacétylation/N-sulfatation des glucosamines<sup>(1)</sup>, l'épimérisation d'acide glucuronique (GlcA) en acide iduronique<sup>(2)</sup> (IdoA) et la O-sulfatation de groupements hydroxyles précis : en C-2 de l'idoA<sup>(3)</sup>, en C-6<sup>(4)</sup> et occasionnellement en C-3<sup>(5)</sup> de la glucosamine. L'arrangement de ces disaccharides définit des zones relativement homogènes et faiblement modifiées ( — ) et des domaines très sulfatés, de séquences hypervariables (domaines S, ■ ). Les domaines S sont bordés de régions plus faiblement sulfatées, appelées domaines de transition ( ▨ ).

Une autre particularité des HS et de l'héparine, liée au mécanisme de fonctionnement de leur voie de biosynthèse (voir paragraphe 1.3.2), est que ces modifications sont localisées dans certaines régions de la chaîne saccharidique. Ceci confère donc à ces polysaccharides une organisation moléculaire unique, où des domaines peu ou pas substitués, présentant donc très majoritairement le motif disaccharidique de base GlcA – GlcNAc, alternent avec des régions hautement substituées, caractérisées par de très forts degrés de sulfatation et d'hétérogénéité structurale. Ces domaines sont respectivement appelés domaines NAc et domaines S, car principalement définis par la nature de leurs résidus glucosamines (N-acétylées ou N-sulfatées). Pour les HS, le taux de N-sulfatation (et donc le pourcentage de la chaîne correspondant à des domaines S) atteint généralement les 50%, alors qu'il dépasse les 80% pour l'héparine. Cette dernière présente donc très majoritairement une structure de type « domaine S » et est beaucoup plus modifiée et sulfatée que les HS. A ce titre, le motif majoritaire retrouvé dans l'héparine est le disaccharide tri-sulfaté [IdoA,2S – GlcNS, 6S]. La présence dans les HS et l'héparine de ces domaines S fortement sulfatés est à l'origine de la

plupart de leurs propriétés biologiques, ceux-ci renfermant l'ensemble de l'information nécessaire à la reconnaissance et à la fixation de leurs ligands protéiques.

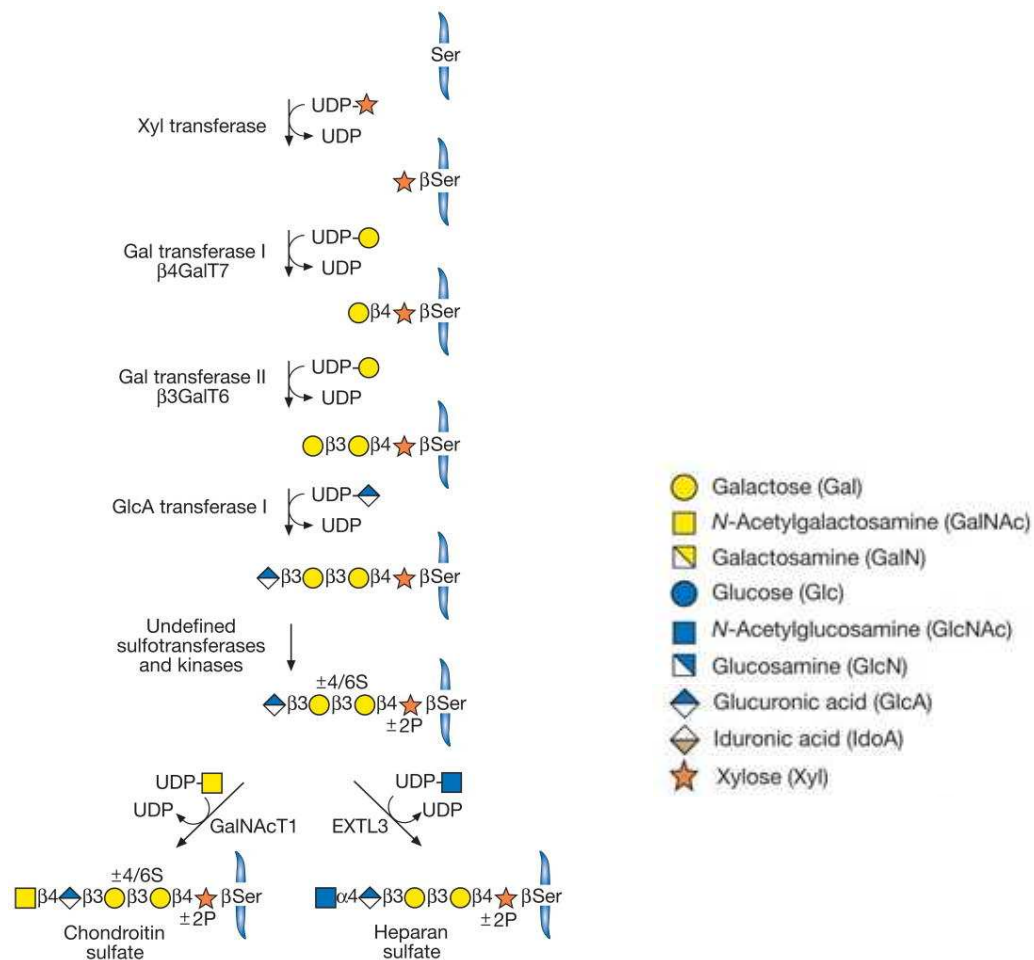
### 1.3.2 Biosynthèse des HS

La biosynthèse des HS est un processus complexe et hautement régulé qui prend place dans l'appareil de Golgi. Il peut se décomposer en trois étapes principales : (i) la formation d'un motif tétrasaccharidique « linker » qui permettra l'attachement de la chaîne polysaccharidique sur le core protéique, au niveau d'un dipeptide Sérine-Glycine ; (ii) la synthèse d'une chaîne saccharidique immature (dite « pro-héparane »), constituée exclusivement de résidus GlcA et GlcNAc ; et (iii) la maturation du polysaccharide par l'action séquentielle d'une série de réactions de modification, comprenant la N-déacétylation/N-sulfatation de résidus glucosamines, la C-5 épimérisation de GlcA en IdoA, la 2-O sulfatation d'IdoA, et la 6-O- (et éventuellement 3-O-) sulfatation de glucosamines [85-88].

#### 1.3.2.1 Formation du tétrasaccharide « linker »

La biosynthèse des GAGs débute avec la formation d'un motif tétrasaccharidique universel (commun à tous les GAGs), de séquence Xyl – Gal – Gal – GlcA, permettant l'attachement de ces polysaccharides au core protéique des protéoglycanes (Figure 3). La première étape de ce processus correspond au transfert par des xylosyl-transférases (XylT-I et XylT-II) d'un xylose d'un substrat UDP-Xyl donneur vers un résidu sérine (occasionnellement thréonine) accepteur de la protéine. Les mécanismes dirigeant l'addition de xylose vers les sites d'attachement précis des chaînes saccharidiques sur les protéoglycanes restent mal connus. Cependant, des études ont suggéré un rôle de séquences d'acides aminés acides à proximité des dipeptides Ser-glycine receveurs [89].

Cette première étape est suivie par l'addition de deux résidus de galactose, réactions catalysées par deux galactosyl-transférases (GalTs), puis d'un GlcA par la glucuronyl-transférase I (GlcAT-I).



**Figure 3 : Biosynthèse des GAGs : formation du tétrasaccharide « linker »**

D'après [9].

### 1.3.2.2 Elongation de la chaîne saccharidique

L'élongation de la chaîne saccharidique à partir du tétrasaccharide « linker » débute par l'addition d'une première hexosamine, dont la nature (galactosamine ou glucosamine) va orienter le processus de biosynthèse vers la voie d'assemblage des CS/DS ou celle des HS (Figure 3). Les mécanismes de régulation de cette étape cruciale demeurent mal connus, mais ceux-ci font très certainement intervenir des motifs structuraux spécifiques présents dans la chaîne polypeptidique du protéoglycane. La présence de groupements d'acides aminés acides et/ou hydrophobes proches du site d'ancrage Ser-Gly semble, par exemple, promouvoir la synthèse de chaînes d'HS [90-91]. Un rôle de motifs peptidiques plus éloignés a également été suggéré [92]. Par ailleurs, des substitutions du tétrasaccharide « linker », telles que la 4-O-



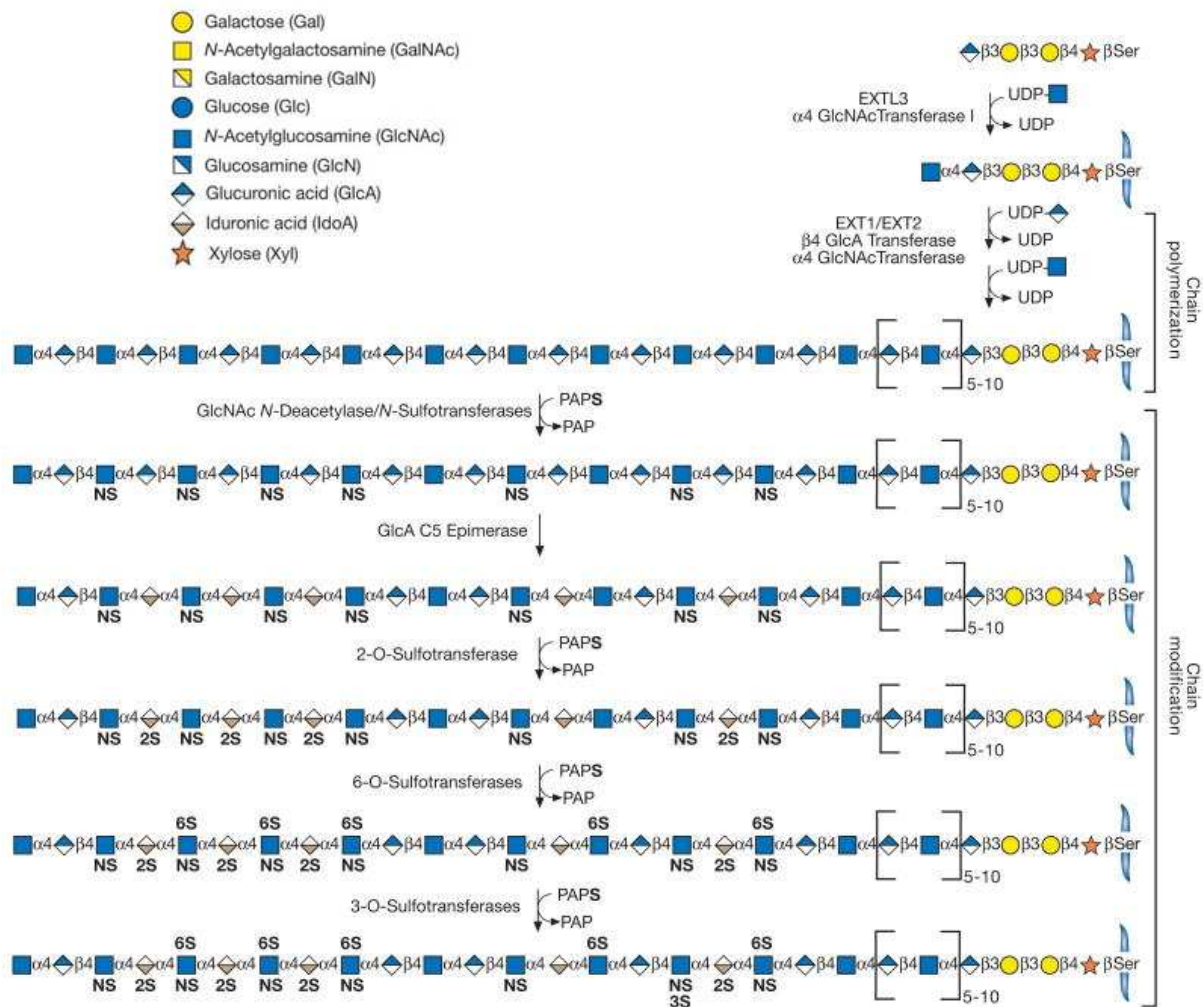
ou la 6-O-sulfatation des résidus Gal, ou encore la 2-O-phosphorylation du xylose, semblent également intervenir dans la régulation de ces étapes [93]. Ainsi, il a été montré que les résidus Gal<sub>4</sub>S n'étaient retrouvés que sur les tétrasaccharides porteurs de chaînes de CS et sembleraient inhiber l'activité glucosaminyl-transférase [93-95]. Plusieurs enzymes semblent impliquées dans ce processus, telles que les EXTL2 et EXTL3 (pour l'addition de glucosamine) ou les GalNAcT-I et GalNAcT-II (ajout de galactosamine). De façon surprenante, dans certaines conditions, l'enzyme EXTL2 peut également présenter une activité galactosaminyl-transférase [96]. Cependant, elle catalyse alors la formation d'une liaison de type  $\alpha(1-4)$ , alors que les CS/DS sont assemblés *via* des liaisons  $\beta(1-4)$ . Le rôle biologique de cette activité enzymatique n'a pour l'instant pas été déterminé.

Une fois la première hexosamine ajoutée, l'assemblage des chaînes d'HS se poursuit par addition séquentielle de GlcA et de GlcNAc par les enzymes EXT1 et EXT2. Dans le Golgi, ces enzymes forment un hétérodimère présentant la double activité glucuronyl- et glucosaminyl-transférase (Figure 4). D'autres enzymes, telles que les EXTL1 et EXTL3, ont été identifiées comme ayant une activité glucosaminyl-transférase, mais leur contribution dans le processus d'élongation des chaînes d'HS demeure mal connue.

#### *1.3.2.3 Maturation de la chaîne*

La dernière étape de synthèse des HS correspond à une série de modifications catalysées par des enzymes ou des familles d'enzymes, qui vont conférer au polysaccharide mature ses caractéristiques de sulfatation et de diversité structurale (Figure 4).

Les modifications débutent par l'action des NDSTs (N-déacétylases/N-sulfotransférase), enzymes présentant une double activité de déacétylation des glucosamines et de sulfatation des groupements amines libres ainsi générés. Cette famille comprend quatre membres : NDST1-4. NDST1 et NDST2 sont exprimés dans la plupart des tissus, alors que NDST3 et NDST4 ne sont retrouvés que dans les tissus neuronaux et durant le développement embryonnaire [97].



**Figure 4 : Biosynthèse des GAGs : élongation et maturation de la chaîne saccharidique**

D'après [9].

La N-déacétylation/N-sulfatation des glucosamines est considérée comme une des étapes les plus importantes de la biosynthèse des HS. En effet, de par sa position en amont des autres réactions de modification, elle va contribuer à définir l'ébauche des domaines S et leur organisation le long de la chaîne. Par ailleurs, du fait du caractère séquentiel du processus de biosynthèse, cette première étape va grandement influencer l'action de l'ensemble des réactions suivantes et par conséquent, le degré de modification/sulfatation du polysaccharide. Ainsi, le degré de N-sulfatation étant un des principaux critères de distinction entre héparine et HS, il est considéré que l'action des NDSTs correspond au point de divergence dans les voies de synthèse de ces deux polysaccharides. Cependant, malgré l'importance de cette étape, les mécanismes de régulation en jeu sont mal connus. La contribution de chacune des

isoformes dans ce processus demeure elle aussi mal comprise, même si un certain nombre d'indications suggèrent qu'elles ont des fonctions biologiques distinctes [97-98]. L'étude de souris KO pour les NDSTs a ainsi montré que seule une déficience en NDST1 conduisait à la production d'HS significativement sous-sulfatés, l'absence des autres isoformes étant généralement atténuée par des phénomènes de compensation. De manière intéressante, les souris KO pour NDST2 présentent un phénotype normal pour la synthèse d'HS dans tous les tissus, mais ne réalisent pas la synthèse d'héparine dans les mastocytes. Une hypothèse est que la NDST catalyse la N-sulfatation jusqu'à un certain niveau et que la NDST2 peut alors reconnaître et agir au niveau de ces régions pré-N-sulfatées pour permettre la synthèse d'héparine et des formes d'HS les plus fortement sulfatées. En parallèle, il a été montré que la NDST3 présentait une activité N-déacétylase supérieure à son activité N-sulfotransférase [99]. En conséquence, l'action de cette isoforme pourrait conduire à la formation de résidus glucosamines atypiques présentant un groupement NH<sub>3</sub> libre, résidus ayant déjà été associés avec des fonctions biologiques particulières [100].

Les deux cycles de modification suivants correspondent à la C-5 épimérisation de GlcA en IdoA et à la 2-O-sulfatation des acides uroniques. Contrairement aux autres étapes de la biosynthèse, ces deux réactions sont respectivement catalysées par des enzymes uniques, la glucuronyl C-5 épimérase, récemment renommée HSeppi, et la 2-OST [101-102]. L'action de ces enzymes semble étroitement contrôlée par leur spécificité de substrat. Ainsi, l'activité de HSeppi est dépendante de la présence de glucosamines N-sulfatées (au moins en C4 de l'uronate) adjacentes, ceci expliquant l'absence d'IdoA dans les domaines NAc. De la même manière, la 2OST agit quasi exclusivement sur les IdoA. Ces enzymes semblent en fait travailler de concert, certains travaux suggérant qu'elles pourraient exister sous forme d'hétérodimères dans le Golgi. La C5-épimérisation est une réaction réversible conduisant à un équilibre entre GlcA et IdoA. Au contraire, la 2-O-sulfatation est un processus irréversible qui pourrait donc déplacer l'équilibre entre épimères en faveur de la forme IdoA. Il est cependant intéressant de noter que des résidus GlcA<sub>2</sub>S ont été retrouvés dans les HS issus de cerveau [103]

Suite à la 2-O-sulfatation, les HS sont alors O-sulfatés en C6 de la glucosamine par les enzymes de la famille des 6OSTs, comprenant 3 isoformes. La réaction de 6-O-sulfatation ne semble pas aussi strictement dépendante des étapes de modification précédentes et des groupements 6S peuvent être ajoutés sur des résidus GlcNAc ou GlcNS, notamment dans les

domaines de transition. L'existence de spécificité de substrat entre les différentes 6OSTs n'a à ce jour pas été clairement établie, mais la 6OST1 est indiscutablement l'isoforme prépondérante de cette famille et est considérée comme responsable de la 6-O-sulfatation des HS dans la plupart des tissus [104]. Enfin, une dernière famille d'enzymes, les 3OSTs, vont catalyser la 3-O-sulfatation des glucosamines. Cette large famille de 6 isoformes (plus un variant de la 6OST3 issu d'épissage alternatif) a été intensivement étudiée, du fait de l'importance de ces groupements sulfates pour les propriétés anticoagulantes de l'héparine et des HS. Ainsi, la structure des formes 3OST1, 3OST3 et 3OST5 a été résolue par cristallographie aux rayons X [105-107]. Par ailleurs, des informations sont disponibles sur la spécificité de substrat des diverses isoformes de 3OSTs et sur l'activité des motifs générés dans deux systèmes biologiques où la 3-O-sulfatation est cruciale : la fixation à l'antithrombine III et le rôle de récepteur d'entrée pour l'HSV (Table 2).

3OST	AT-III	HSV
3OST1	✓	
3OST2		✓
3OST3A		✓
3OST3B		✓
3OST4		✓
3OST5	✓	✓
3OST6		✓

**Table 2 : Génération des motifs 3-O-sulfatés de fixation de l'AT-III ou d'entrée de l'HSV-1 par les différentes isoformes de 3OSTs**

### 1.3.3 Le catabolisme des HS

Afin de permettre une adaptation rapide de la cellule aux évolutions de son environnement, les protéoglycanes et les chaînes d'HS qu'ils portent sont rapidement recyclés (demi-vie de ~3-4 heures) et renouvelés à la surface cellulaire [108]. Classiquement, la voie de catabolisme

des HS implique une internalisation par endocytose, suivie d'une dégradation suite à l'action concertée d'endoenzymes, qui vont tout d'abord dépolymériser les chaînes d'HS en oligosaccharides, puis d'exoenzymes qui vont alors réduire ces oligosaccharides en monosaccharides et en sulfate inorganique. Des mutations ou des défauts dans cette machinerie de recyclage des HS provoquent généralement une accumulation de fragments d'HS partiellement dégradés, conduisant à des pathologies graves nommées mucopolysaccharidoses (MPS).

Récemment, des travaux ont montré que certaines enzymes de dégradation avaient une activité extracellulaire et conduisaient à un remodelage des HS matriciels et de la surface cellulaire ayant des conséquences fonctionnelles extrêmement importantes.

#### *1.3.3.1 Les Héparanases*

Les héparanases sont des endo- $\beta$ -glucuronidases exprimées dans une grande variété de tissus. Chez l'homme, l'héparanase est synthétisée sous la forme d'une protéine précurseur de 65 kDa. Celle-ci subit alors un clivage protéolytique qui conduit à la forme mature de l'enzyme, représentée par un complexe non-covalent de deux sous-unités de 8 et 50 kDa. La sous-unité de 50 kDa présente six sites de glycosylation potentiels, glycosylation qui ne semble pas indispensable pour l'activité catalytique, mais jouerait un rôle dans la sécrétion de l'enzyme [109]. Depuis plus de 25 ans, les héparanases étaient connues pour leur implication dans le catabolisme des HS à l'intérieur des cellules. Mais récemment, des travaux ont également mis en évidence une activité extracellulaire de ces enzymes, jouant un rôle important dans le remodelage des matrices extracellulaires durant l'inflammation, l'angiogénèse, la croissance tumorale et les processus de métastatisation [110-113]. Depuis, les héparanases ont été intensivement étudiées et sont devenues des cibles majeures de nombreuses approches thérapeutiques anti-cancéreuses [114-116]. Outre son rôle dans la dégradation des HS, il a aussi été montré que les héparanases promouvaient l'adhésion cellulaire et ce, indépendamment de leur activité enzymatique [117].

En 2000, un gène présentant 40% d'identité à celui de l'héparanase a été identifié comme le gène de l'héparanase 2 [118]. Par épissage alternatif, ce gène code en fait pour trois héparanases différentes. Cependant, à ce jour, aucune activité enzymatique n'a été associée

avec ces protéines et leur fonction biologique demeure inconnue. Il reste néanmoins intéressant de noter que les héparanases 1 et 2 présentent des profils d'expression de leurs ARNm très différents dans les tissus. Enfin, bien que ne présentant aucun lien structural, une activité héparanase a été mise en évidence chez la CXC chimiokine CTAP-III (Connective Tissue Activating Peptide III) [119]. Ici encore, l'importance physiologique de ces activités enzymatiques reste mal connue.

L'héparanase dégrade les chaînes d'HS en larges fragments d'environ 5-6 kDa (soit 20-22 unités saccharidiques). La coupure du polysaccharide s'effectue au niveau des GlcA, mais nécessite la présence de GlcNS à proximité. En conséquence, l'activité des héparanases est principalement focalisée sur les régions de transition entre domaines NAc et S et conduit à la libération de larges fragments de type « domaine S ». L'activité de l'héparanase sur les protéoglycanes de la matrice a donc un triple effet : elle déstabilise la cohésion matricielle et facilite ainsi la migration cellulaire, l'invasion et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ; elle libère les cytokines et facteurs de croissance (VEGF, FGFs...) associés à la matrice qui vont alors induire de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire et la néovascularisation ; elle catalyse la libération de fragments d'HS présentant une structure de type domaine NS, biologiquement actifs, capables de promouvoir l'activité de ces facteurs de croissance [120-121].

#### *1.3.3.2 Les Sulfs*

Les Sulfs sont une famille de sulfatases récemment découvertes, qui présentent la particularité d'être excrétées dans l'environnement extracellulaire par la voie du Golgi, et se localisent à la surface cellulaire et dans les matrices. D'abord mise en évidence chez la caille (QSulf-1), des orthologues ont ensuite été isolés et clonés chez la souris, le rat et l'homme, et un second membre de cette famille, Sulf-2, a été identifié [122-124]. Sulf-1 et Sulf-2 présentent un degré de similarité relativement modeste (63-65% d'identité de séquence chez l'homme et chez la souris), mais possèdent une organisation moléculaire commune [123, 125-126] ; ce sont de larges protéines (870-875 AA, en fonction des espèces) constituées de quatre domaines (Figure 5) : une séquence signal clivable (SP), un domaine catalytique (CAT), un domaine basique/hydrophile (HD) et une région C-terminale (C-Ter).



**Figure 5 : Organisation en domaines des Sulfs**

Bien que l'homologie avec les autres sulfatases d'origine mammifère soit très limitée, un très fort degré de conservation est observé au niveau du site actif de ces enzymes. En particulier, une cystéine située dans la partie N-terminale du domaine catalytique est retrouvée chez toutes les sulfatases eucaryotes. Ce résidu subit une modification post-traductionnelle pour être converti en N-formylglycine (FGly) et est essentiel pour l'activité enzymatique [126-127]. Au contraire, le domaine HD est une caractéristique propre des Sulfs qui n'est retrouvée chez aucune autre sulfatase. Il est particulièrement riche en acides aminés basiques avec notamment un motif de 12 résidus basiques consécutifs présent à son extrémité C-terminale. Ce domaine est impliqué dans la fixation des HS et dans l'ancrage de l'enzyme à la surface cellulaire. Les Sulfs présentent également 10-11 sites de N-glycosylation potentiels, principalement situés dans leur région N-terminale. Pour QSulf-1, la glycosylation est nécessaire à la reconnaissance du substrat, l'activité enzymatique, la sécrétion et l'adressage à la surface cellulaire [128]. Le rôle des glycosylations chez les Sulfs humaines n'est pas encore bien défini. Cependant, une étude récente suggère que pour HSulf-1, elles ne sont pas impliquées dans la reconnaissance du substrat ou la localisation à la membrane [125]. Enfin, les Sulfs présentent dans leur séquence des sites de clivage potentiels à la furine. L'un d'entre eux est présent dans la région interne du domaine HD et serait impliqué dans les processus de maturation de la protéine en un hétérodimère non-covalent [129]. Cependant, le rôle exact de ce phénomène demeure mal défini.

Les Sulfs sont des enzymes présentant une activité aryl-sulfatase à pH neutre. Contrairement à l'ensemble des autres sulfatases, leur activité est extracellulaire. Elles y catalysent la 6-O-désulfatation spécifique des HS cellulaires matriciels. Le mécanisme enzymatique en jeu se base sur la présence du résidu strictement conservé FGly issu de modifications post-traductionnelles, qui supporte l'hydrolyse du groupement sulfate *via* une réaction de trans-estérification [126]. Les spécificités de substrat de l'enzyme restent mal connues. Le domaine catalytique comprenant le résidu FGly est suffisant pour promouvoir l'activité aryl-sulfatase

et l'hydrolyse de pseudo-substrats, tels que le 4-méthylumbelliferyl sulfate (4-MUS). Cependant, la 6-O-désulfatation de substrats naturels, comme les HS ou l'héparine, demande également la présence du domaine HD. Pour les HS, les groupements 6-O-sulfates se retrouvent principalement au sein des domaines S, mais également dans les régions bordant ces domaines (voir Figure 2). De manière intéressante, les Sulfs agissent exclusivement sur les disaccharides tri-sulfatés [UA(2S) – GlcNS(6S)], disaccharides caractéristiques des régions les plus internes des domaines S [123, 130]. Aucune 6-O-désulfatation n'est observée sur un autre type de disaccharide 6-O-sulfaté. De plus, la 6-O-désulfatation catalysée par les Sulfs n'est pas exhaustive : en fonction des études, le traitement de chaînes d'HS avec HSulf-1 ou HSulf-2 aboutit à une perte de 50-70% du disaccharide [UA(2S) – GlcNS(6S)], ceci correspondant à une moyenne de 6-O-désulfatation d'environ 15%. Ramenée à la charge totale du polysaccharide, l'action des Sulfs ne produit donc qu'une réduction de 4-5% de la sulfatation.

Pourtant, de manière remarquable, ces faibles modifications dans la structure des HS conduisent à des altérations massives de leurs propriétés fonctionnelles. En modifiant les profils de 6-O-sulfatation au cœur des domaines S, les Sulfs affectent la capacité du polysaccharide à moduler l'activité d'un grand nombre de facteurs de croissance, de morphogènes et de chimiokines [130-131]. Les Sulfs jouent ainsi un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, tels que le développement et la régénération tissulaire [122, 132-134]. Elles sont également impliquées dans la progression tumorale, les études menées sur le sujet ayant montré une activité pro- ou anti-oncogénique, en fonction des modèles biologiques considérés et des voies de signalisation mobilisées [135-139].

#### 1.3.3.3 Le « *Shedding* »

Bien que non directement lié aux modifications des HS, le processus de « *Shedding* » décrit pour les Syndécans joue un rôle critique dans la régulation de l'activité de ces polysaccharides à la surface cellulaire. Comme expliqué précédemment (voir paragraphe 1.1.2.1), les domaines extracellulaires des Syndécans peuvent être séparés du reste de la protéine par clivage protéolytique au niveau d'un site de coupure proche de la membrane plasmique. Les enzymes impliquées dans ce phénomène sont des métalloprotéinases matricielles (MMP) et



des membres de la famille des ADAMs (disintegrin and metalloproteinase). Le Shedding est un processus constitutif faisant partie intégrante du recyclage des Syndécans, mais il peut être accéléré par un certain nombre de stimuli, tels que des facteurs de virulence bactérienne, des chimiokines, des facteurs de croissance ou en réponse au stress.

Le Shedding des Syndécans a des conséquences fonctionnelles importantes car il permet la libération de chaînes d'HS intègres, présentant l'ensemble de leurs activités biologiques. Il a été par ailleurs montré que les Syndécans-1 présents à la surface cellulaire présentaient des propriétés différentes de celles de leurs ectodomains libérés à l'issue du Shedding. Sur des cellules MCF-7 d'adénocarcinome, ces derniers (comparé au Syndécan-1 entier de surface) inhibent la prolifération cellulaire, mais favorisent l'invasion [140]. Par ailleurs, le Shedding de Syndécan-1 a également été associé à la permissivité à *Pseudomonas aeruginosa* [141], et celui du Syndécan-4 permettrait d'augmenter les distances d'action des facteurs de croissance exprimés durant l'induction du mésoderme [142].

#### **1.4 INTERACTION HS/PROTEINES**

Les multiples propriétés des PGs s'expliquent, dans l'immense majorité, par la capacité de leurs chaînes polysaccharidiques à fixer et, dans certains cas, à moduler l'activité d'une très grande variété de protéines (voir Table 3). L'étude de ces interactions, à la fois d'un point de vue structural, dynamique et fonctionnel, constitue donc une étape essentielle vers la compréhension des phénomènes biologiques liés à ces molécules.

##### **1.4.1 Rôle fonctionnel**

Devant l'étendue des processus biologiques impliquant les HS, il serait impossible de dresser une liste exhaustive de leurs différentes fonctions modulatrices. Cependant, un certain nombre d'exemples d'interactions HS/protéines maintenant bien caractérisées illustrent la grande diversité d'activité que présentent ces molécules.

Familles de Protéines	Protéines	fonction
Protéases/Estérases	AT-III, SLPI, C1i, VCP...	Coagulation, voies métaboliques, voies du complément
Facteurs de croissance	FGFs, VEGF, HGF, PDGF...	Prolifération, différenciation et migration cellulaire, angiogénèse
Morphogènes	Wnt, Hedgehog, BMP	Développement, embryogénèse
Cytokines	Il-5, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$ ...	Inflammation, cicatrisation
Chimiokines	SDF, RANTES, PF4...	Inflammation, « Leukocyte Homing »
Protéines fixant les lipides	Annexin V, ApoE	Transport et métabolisme des lipides
Protéines d'adhésion	Sélectines, Fibronectine, Vitronectine, Collagène type V, Laminine	Adhésion, migration, cohésion tissulaire
Pathogènes	VIH, virus de la Dengue, HSV, papillomavirus, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> ...	Infection

**Table 3 : Exemples de protéines fixant les HS**

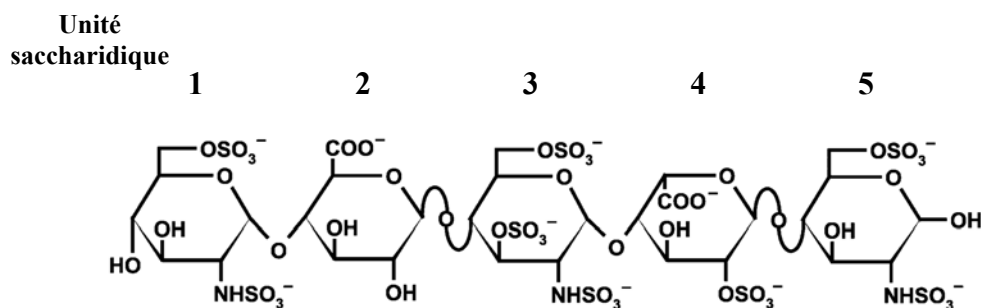
D'après [143] et <http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/cgi-bin/gag/gag.cgi>.

#### *1.4.1.1 Interaction AT-III/HS : activation par induction d'un changement conformationnel de la protéine*

L'activation de l'antithrombine III (AT-III) par les HS et l'héparine constitue, et de loin, le modèle d'interaction protéine/GAGs le plus étudié et le mieux caractérisé. L'AT-III est un membre de la famille des Serpines (Serine Protease Inhibitor) capable d'inhiber l'ensemble des facteurs de la coagulation sanguine (à l'exception du facteur VIIa) et, en particulier, du facteur Xa. L'activité de l'AT-III est fortement dépendante de sa fixation à un motif d'HS spécifique. Cette interaction induit un changement conformationnel de l'AT-III, se traduisant en particulier par l'exposition de la boucle réactive de la protéine, qui va alors permettre la

reconnaissance des protéases cibles, puis après clivage, stabiliser le complexe AT-III/protéase de façon irréversible [143].

La caractérisation structurale du motif saccharidique fixant l'AT-III a été sans nul doute un des plus grands accomplissements scientifiques dans ce domaine et est le fruit du travail mené par plusieurs équipes de recherche durant plus de 15 ans (for review, see [5]). Celles-ci ont conduit à l'identification d'un motif pentasaccharidique présentant en son centre une glucosamine 3-O-sulfatée (Figure 6, [144]). La résolution par cristallographie aux rayons X de la structure du complexe AT-III/pentasaccharide a permis de définir précisément les acides aminés impliqués dans l'interaction, ainsi que la contribution respective de chacune des unités saccharidiques. Ces résultats montrent l'existence de deux sites de fixation distincts sur la protéine, composés des résidus K114, K125 et R129 pour le premier, et des résidus R46 et R47 pour le second. Du côté du sucre, les monosaccharides 1-3 (Figure 6) fixent tout d'abord l'AT-III et induisent le changement conformationnel qui est alors stabilisé par l'interaction avec le disaccharide 4-5, l'acide iduronique en position 4 adoptant une conformation de type  $^2S_0$ .



**Figure 6 : Motif pentasaccharidique de fixation à l'AT-III**

Toujours dans le contexte de la coagulation, et alors qu'un pentasaccharide est suffisant pour activer l'AT-III et promouvoir l'inhibition du facteur Xa, l'inhibition de la thrombine par cette même protéine nécessite un fragment d'HS/héparine beaucoup plus long (16-18 saccharides). Le motif pentasaccharidique est toujours présent dans ce fragment, mais les HS jouent ici un rôle supplémentaire, en fixant les deux protéines simultanément et en facilitant ainsi leur rapprochement et leur interaction.

#### *1.4.1.2 Interaction FGF/HS : rôle de corécepteur*

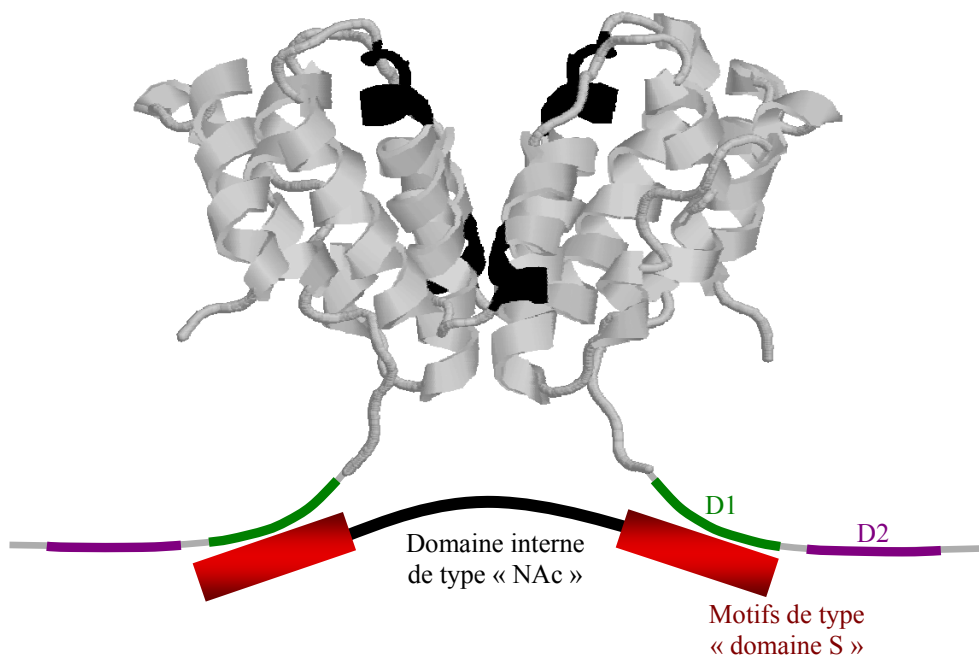
La découverte du rôle des HS comme corécepteur indispensable à l'activité du facteur de croissance FGF-2 [145-146] a été un autre tournant majeur dans la recherche sur ces molécules. Ainsi, si le facteur de croissance peut se fixer à son récepteur en l'absence d'HS, la formation d'un complexe ternaire FGF/FGFR/HS est nécessaire à l'induction d'une réponse cellulaire. L'étude de cette interaction a constitué mon sujet de thèse et les travaux réalisés dans ce domaine sont décrits en détail dans le paragraphe 2.

#### *1.4.1.3 Interaction IFN $\gamma$ /HS : rôle dans la localisation, la protection et la régulation de l'activité*

L'IFN $\gamma$  est une cytokine de 17 kDa présentant des activités immunomodulatrices, antiprolifératives et antivirales [147-148]. Cette protéine est trouvée sous la forme d'un homodimère, stabilisé par des liaisons non covalentes, où les deux monomères s'agencent tête-bêche et s'imbriquent en entrelaçant les sept hélices  $\alpha$  présentes dans leur séquence peptidique. Le dimère d'IFN $\gamma$  se caractérise donc par un cœur extrêmement structuré, d'où dépassent des boucles très flexibles correspondant aux régions C-terminales de chacun des monomères (Figure 7). Ces régions N-terminales contiennent deux domaines riches en acides aminés basiques, les domaines D1 (AA 125-131) et D2 (AA 137-140), qui jouent un rôle important pour l'activité de la cytokine [149]. La réponse cellulaire à l'IFN $\gamma$  est dépendante de sa fixation à un récepteur cellulaire spécifique, l'IFN $\gamma$ R, hétérodimère composé de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , qui va alors induire la voie de signalisation cellulaire des Jak/STAT.

En parallèle, l'IFN $\gamma$  se fixe également avec une haute affinité aux HS. Cette interaction a des conséquences fonctionnelles multiples sur l'activité de la cytokine. Tout d'abord, des études *in vivo* ont montré que la fixation de l'IFN $\gamma$  aux HS régulaient son élimination plasmatique et sa distribution tissulaire [150-151]. Par ailleurs, les interactions IFN $\gamma$ /HS et IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R sont antagonistes. Les HS, présents en abondance à la surface cellulaire, agissent ainsi comme des régulateurs négatifs de l'accès de l'IFN $\gamma$  à son récepteur, et donc de son activité biologique. La fixation des HS sur l'IFN $\gamma$  s'effectue au niveau du domaine D1 situé dans la région C-terminale de la cytokine [152]. Les domaines D1 et D2 présentent une grande sensibilité à la

protéolyse. La perte de ces deux domaines se traduit par une très forte diminution des propriétés fonctionnelles de l'IFN $\gamma$ . A l'inverse, la coupure des 10 derniers acides aminés (perte du domaine D2 seulement) conduit à une potentialisation de l'activité de la cytokine [150]. En se fixant spécifiquement au domaine D1, les HS le protègent de la protéolyse mais n'empêchent pas l'élimination du domaine D2. Ce mécanisme de protection contribue donc à promouvoir l'activité de la cytokine. Dans un contexte physiologique, l'ensemble de ces effets permet probablement une régulation très fine des propriétés biologiques de l'IFN $\gamma$ .



**Figure 7 : Structure du complexe IFN $\gamma$ /HS**

L'IFN $\gamma$  présente une extrémité C-terminale non structurée comportant deux régions basiques : les domaines D1 et D2. Les domaines D1 de chaque monomère sont impliqués dans l'interaction avec les HS et reconnaissent deux motifs sulfatés (octasaccharides de type domaine S) séparés par une région interne non sulfatée (~dp29 de type domaine NAc). Cette dernière ne participe pas directement à l'interaction, mais permet un espacement des motifs sulfatés adapté à la configuration spatiale du dimère d'IFN $\gamma$ .

#### *1.4.1.4 Interaction Chimioquinas/HS : formation des gradients chimiotactiques*

Les chimiokines sont une famille (une cinquantaine de membres) de petites cytokines. Elles sont en général basiques et présentent toutes des capacités d'interaction avec les HS. Leur fonction est principalement liée au chimiotactisme. Dans ce cadre, l'interaction chimiokine/HS est tout particulièrement importante pour l'établissement des gradients chimiotactiques. Ainsi, les chimiokines sont fixées par les HS dès leur sécrétion. Ceci va

limiter leur diffusion anarchique et diriger la mise en place de gradients de concentration qui vont guider les leucocytes vers les sites inflammatoires [153-154], ou encore dans le cadre du processus de « Homing ». Ainsi, il a été montré que l'élimination des HS (par traitement enzymatique) de la surface de l'endothélium abolissait l'adhésion des lymphocytes T induite par les chimiokines RANTES et MIP-1 $\alpha$  [155-157]. Dans des expériences *in vivo* menées chez le singe, l'interaction des HS avec la chimiokine SDF1 $\alpha$  a été inhibée par injection de polysaccharides sulfatés (fucoïdanes), conduisant à une déstabilisation des gradients chimiotactiques et des réservoirs de chimiokines immobilisées par les HS. Ceci s'est alors traduit par un relargage de SDF1 $\alpha$  de la moelle osseuse vers le plasma, et des cellules progénitrices hématopoïétiques dans la circulation sanguine [158].

#### *1.4.1.5 Interaction pathogènes/HS : implication multifonctionnelle au cours de l'infection*

Outre leur implication dans une multitude processus physiologiques, les larges propriétés interactives des HS sont également exploitées par un grand nombre d'agents pathogènes comme sites d'ancrage à la surface de l'hôte.

Parmi eux se trouvent des parasites (*Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*...), des bactéries (*Helicobacter pilori*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*...) et de très nombreux virus (HSV, HIV, papillomavirus, virus de la Dengue, adénovirus...). Pour la plupart de ces pathogènes, les HS servent de récepteurs d'attachement permettant la concentration à la surface cellulaire et facilitant l'accès aux récepteurs d'entrée. Cependant, les études menées dans ce domaine, et notamment sur les virus, ont montré que les HS pouvaient jouer de nombreux autres rôles au cours de l'infection.

Ainsi, des travaux réalisés sur le virus de l'herpès (HSV-1) [159] et de la vaccine [160] ont montré que les HS pouvaient également jouer un rôle de récepteur d'entrée et intervenir dans les processus de fusion membranaire. De plus, pour HSV-1, le motif d'HS permettant l'entrée *via* une interaction avec la glycoprotéine d'enveloppe gD se caractérise par la présence de groupements 3-O-sulfates issus de l'action de 3OST particulières, les isoformes 3OST-3A et 3OST-3B [161]. Cette observation est d'une toute particulière importance, car elle suggère un

degré de spécificité très élevé pour la reconnaissance de motifs de fixation aux HS par le virus.

De nombreux travaux ont également été menés sur l'utilisation des HS par le VIH. Ceux-ci seront décrits en détail dans le paragraphe 3.1 et ont permis d'identifier de nouvelles fonctions de ces polysaccharides au cours de l'infection. Dans ce cadre, il a été montré que les HS servent de récepteur d'attachement permettant au virus de se concentrer à proximité de ses récepteurs d'entrée et peuvent promouvoir l'infection en compensant le faible taux de molécules CD4 exprimées par certaines cellules, telles que les macrophages [162]. En parallèle de ce mécanisme d'infection *en cis*, les HS peuvent stocker et protéger le virus à la surface de cellules non permissives, puis le transférer à des cellules permissives suivant un mode d'infection dit *en trans* [163-164]. A la surface des muqueuses, qui correspondent au point d'entrée du virus dans l'organisme, Les HS présents en abondance fixent le virus et permettent sa translocation à travers la barrière épithéliale [165-167]. De manière similaire, ils semblent également impliqués dans le passage du VIH au travers de l'endothélium formant la barrière hémato-encéphalique, *via* un mécanisme de transcytose [168-170]. Enfin, en fixant préférentiellement les virus de type X4, les HS pourraient participer à la formation de réservoirs viraux et au phénomène de sélection tropique s'opérant au cours de l'infection (isolats de type R5 prépondérants dans les premières phases de l'infection). Finalement, les HS interviennent également dans l'infection par le VIH en servant de récepteur au facteur de transactivation viral Tat (TransActivator of Transcription). La fixation de Tat par les HS le protège de la protéolyse et est indispensable à son internalisation et à l'activation de la transcription [171-174]. Un mécanisme similaire a également été observé pour le facteur de virulence NS1 (Non Structural protein-1) du virus de la Dengue [175].

Face à l'abondance des travaux réalisés sur les virus, le rôle des HS dans l'infection par les bactéries reste relativement mal documenté. Des études ont cependant suggéré que l'action de ces polysaccharides pourrait être détournée par certaines bactéries afin de neutraliser les systèmes de défense de l'hôte. Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus pyogenes* sécrètent des protéases pouvant dégrader la Décorine et permettre la libération de chaînes de DS dans le milieu extracellulaire [176]. Ces polysaccharides seraient alors capables de se fixer et d'inactiver des peptides cationiques antimicrobiens de l'hôte, tels que les Défensines ou les Cathélicidines. De façon très similaire, des protéases sécrétées par *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* peuvent induire le

Shedding de Syndecan-1 et permettre la libération d'ectodomains porteurs de chaînes d'HS alors capables d'inhiber certains facteurs de défense de l'hôte (Défensines, Cathélicidines, Collectines...) [141, 177-179].

## **1.4.2 Aspects structuraux des interactions HS/protéines**

### *1.4.2.1 Du côté de la protéine*

Du fait de leur fort potentiel électronégatif, les interactions protéines/HS sont majoritairement de nature électrostatique. Elles font intervenir des motifs saccharidiques généralement situés dans les domaines S du polysaccharide, et des acides aminés basiques de la protéine, principalement des arginines et des lysines, et plus occasionnellement des histidines. Il est cependant important de noter que d'autres types de liaison peuvent également contribuer de façon significative à ces interactions. Ainsi, seulement 30% de l'énergie libre nécessaire à la formation d'un complexe FGF-2/HS est de nature purement électrostatique, le reste étant apporté par des liaisons hydrogène et de Van der Waals [180].

Les motifs de reconnaissance aux HS ont été déterminés pour un grand nombre de protéines. La comparaison de ces données a permis de définir deux types de séquences consensus de fixation aux HS : les motifs XBBXBX et XBBBXXBX (où B correspond à un AA basique, et X un AA neutre ou hydrophobe) [181]. Cependant, l'étude de nouveaux ligands a fortement remis en cause l'universalité de ces séquences. Des analyses par mutagenèse dirigée [182] et la caractérisation structurale de complexes protéine/héparine par RMN [183], cristallographie aux rayons X [184] ou par modélisation moléculaire [185] ont également démontré que les sites de fixation aux HS ne sont pas exclusivement composés de séquences linéaires. Ils peuvent également être constitués par des épitopes conformationnels comprenant des AA distants agencés dans une orientation spatiale précise par le repliement de la protéine. Ainsi, l'identification de domaines d'interaction potentiels sur la seule base d'une analyse de séquence demeure hautement spéculative.



#### 1.4.2.2 Du côté du sucre

L'identification de motifs saccharidiques spécifiques à une interaction donnée demeure encore d'une extrême complexité. Les premiers travaux sur le motif pentasaccharidique de fixation à l'AT-III avaient conduit à l'hypothèse de l'existence de « séquences uniques » de reconnaissance d'un ligand donné, ou tout au moins de motifs saccharidiques d'un très haut niveau de spécificité structurale. Cependant, l'accumulation des travaux sur les interactions protéines/HS a largement remis en cause ce principe et, à l'exception des motifs contenant des glucosamines 3-O-sulfatées, le degré de spécificité structurale requis pour permettre une interaction reste encore très ouvert au débat. Cette question pourrait d'ailleurs rester longtemps sans réponse, et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les caractéristiques moléculaires du polysaccharide permettent de concevoir une spécificité de reconnaissance sur plusieurs niveaux. Celle-ci peut se faire au niveau du groupement sulfate, avec une nécessité de présence de groupements sulfates précis, tels que les 3-O-S pour la fixation de l'AT-III ou les 6-O-S pour l'activation du FGF-2. Elle peut se faire également au niveau du profil de sulfatation ; autrement dit faire intervenir des arrangements particuliers de groupements sulfate les uns par rapport aux autres ; comme illustré par le découplage entre motif de fixation et motif d'activation du FGF-2. Enfin, elle peut s'exprimer au niveau de l'organisation en domaines des chaînes d'HS, un exemple de ce type de situation étant celui de l'IFN $\gamma$ , reconnu par un motif d'HS multi-domaine de type S/NAc/S (Figure 7) où la région NAc centrale intervient de manière indirecte dans l'interaction en permettant un espacement approprié des motifs sulfatés de type « domaine S » avec le dimère d'IFN $\gamma$ .

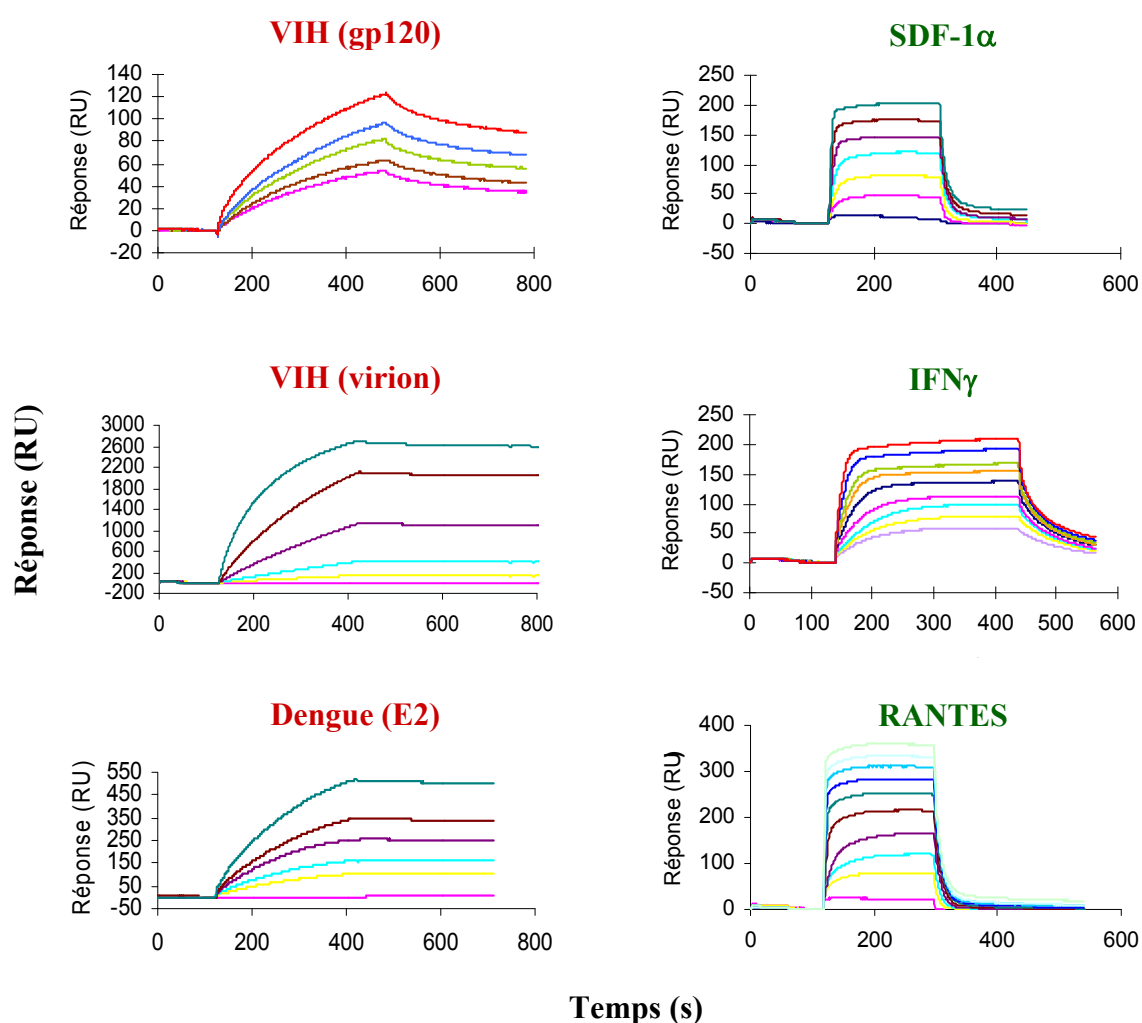
Par ailleurs, les profils de sulfatation nécessaires une activité biologique donnée restent extrêmement difficiles à déterminer car la présence de sulfates redondants dans l'héparine et les HS, si elle ne gêne généralement pas la fixation du ligand, masque le motif structural minimum requis pour cette interaction. Dans le cas du FGF, qui constitue une protéine modèle pour l'étude des HS, la perspective générale est également obscurcie par une abondance de paramètres qui augmentent considérablement la complexité du système. Celui-ci souffre en effet de la présence dans cette famille de nombreux facteurs de croissance (et de multiples isoformes) présentant des propriétés de fixation aux HS distinctes [186-188], de plusieurs récepteurs (et d'isoformes de ces récepteurs) qui interagissent également avec les HS [189-190] et de motifs saccharidiques d'HS distincts pour la formation/stabilisation de différents complexes de FGF/FGFR [191-192] ou pour la médiation de réponses cellulaires spécifiques.

Enfin, la génération de souris KO pour l'expression des diverses sulfotransférases de la voie de biosynthèse des HS a conduit, pour certaines d'entre elles, à des altérations phénotypiques relativement mineures. Ce résultat surprenant, au regard des vastes propriétés biologiques des HS, suggère que des phénomènes de compensation pourraient exister entre les différents groupements sulfate [88, 193-194]. D'autres paramètres qui pourraient également avoir une importance significative n'ont pas été étudiés en détail, tels que le rôle des ions, ou encore de la conformation spatiale des HS dans les interactions avec les protéines. Il a par exemple été montré que pour s'adapter à la forme du FGF-2, la chaîne d'HS devait former un coude [195]. Il est également important de noter que les oligosaccharides issus de digestions de chaînes d'HS qui ont servi de base pour de nombreuses études pourraient présenter des propriétés biologiques très différentes lorsqu'ils sont « enfouis » dans le polysaccharide entier. Enfin, une hypothèse très attractive serait que la spécificité structurale des HS ne pourrait être révélée par l'analyse linéaire de séquences saccharidiques, mais plutôt en considérant l'arrangement tridimensionnel des groupements sulfate et carboxylique qui définirait une empreinte moléculaire spécifique pour chaque oligosaccharide considéré [196]. La compréhension de ces questions de spécificité sera probablement le challenge majeur des années à venir. Dans ce cadre, les développements méthodologiques, les progrès en synthèse totale d'oligosaccharides, l'émergence des micro-arrays dédiés à la glycobiologie et de systèmes automatisés pour l'analyse des HS devraient fortement contribuer à améliorer notre connaissance de ces molécules.

### 1.4.3 Dynamique de l'interaction

Un dernier aspect de l'étude des interactions protéines/HS concerne les paramètres dynamiques régissant ces interactions. Même si ce domaine demeure relativement peu exploré, il est désormais évident que la fixation des protéines aux HS peut s'effectuer selon des cinétiques très différentes et que celles-ci peuvent influencer leurs propriétés biologiques. Ainsi, une étude menée sur le FGF-2 il y a plus de 10 ans avait émis l'hypothèse que des motifs de fixation de relativement basse affinité (présentant des  $k_{on}$  faibles), mais pas des motifs de haute affinité (et de forts  $k_{on}$ ), conduisaient à l'activation du facteur de croissance [197]. Plus récemment, des travaux réalisés sur les deux isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  de CXCL12 ont révélé que l'affinité de la deuxième pour les HS étaient fortement accrue (principalement du fait d'un  $k_{off}$  considérablement plus faible) et que ceci avait des conséquences importantes sur

les capacités de diffusion de la chimiokine dans les tissus [198-199]. La compilation de certains travaux du laboratoire, sur des protéines d'enveloppe virale et sur des cytokines/chimiokines présentant des affinités pour les HS relativement comparables, illustre également très bien ce phénomène (Figure 8). La fixation des protéines virales se caractérise par des constantes cinétiques ( $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) faibles, indiquant une interaction lente mais aboutissant à la formation de complexes très stables, ce qui est en adéquation avec la fonction d'ancrage du virus sur la cellule hôte. A l'inverse, les chimiokines se fixent de manière plus rapide et plus transitoire aux HS ( $k_{on}$  et  $k_{off}$  forts), ce qui semble se justifier de la part de protéines de signalisation dont l'activité et la biodisponibilité doivent être finement régulées.



**Figure 8 : Analyse par spr des dynamiques d'interaction des HS avec des protéines d'enveloppe virales ou des cytokines/chimiokines**

## **2 LE PASSE : ROLE DES HS DANS LA PROMOTION DE LA REPONSE AU FGF-2**

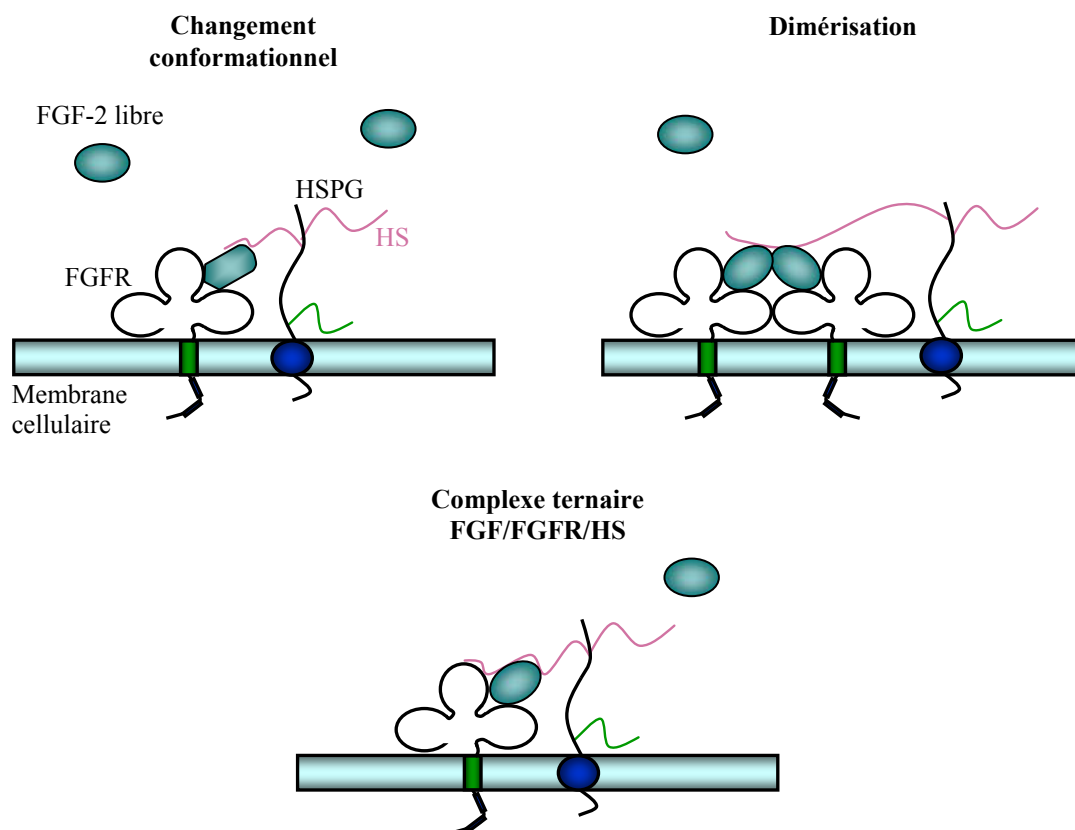
En 1995, j'ai effectué mon stage de fin d'étude dans le département d'hémobiochimie du centre de Recherche Sanofi à Toulouse, sous la direction de Pierre Savi, et en collaboration avec Maurice Petitou. Assez paradoxalement, mon travail au sein de ce laboratoire privé, dans une équipe internationalement reconnue pour la qualité de ses recherches sur l'Héparine, ne portait pas sur les GAGs, mais sur l'interaction de protéines d'adhésion, les Sélectines, avec des motifs saccharidiques de type Sialyl LewisX (SLeX). A l'issue de ce stage, j'ai saisi l'opportunité de prolonger mon expérience dans le domaine de la recherche et par là même, d'éviter mon incorporation dans le 18<sup>ème</sup> Régiment de Transmission d'Epinal, en effectuant un CSN scientifique pour Sanofi. C'est dans ce cadre que je suis arrivé au Paterson Institute à Manchester, dans le laboratoire du professeur John Gallagher.

Notre premier entretien s'est soldé par un immense malentendu. Lui croyait que j'étais un déserteur de l'armée française en exil. Moi... Je dois bien reconnaître que malgré tous mes efforts et l'impeccable accent britannique de John, je n'avais pas saisi grand-chose de notre conversation, ni de ce qu'il attendait de moi durant mon séjour dans son laboratoire ! Un seul message était clairement passé : il était hors de question pour moi de poursuivre mes travaux en thèse à l'issue de mon service national. A cette époque, je ne connaissais pas la détermination de John et sa manière subtile de ne jamais contredire, mais de lentement éroder les résolutions les plus fermes. Il ne lui aura fallu que 6 mois pour me faire signer mon dossier d'inscription à l'Université de Manchester.

### ***2.1 INTERACTION FGF-2/HS : ETAT DE L'ART EN 1996***

J'ai débuté mes travaux à Manchester en 1996, dans un contexte où le FGF-2 représentait la protéine du moment dans le domaine des interactions avec les HS. Dans cette période de « l'après 1991 », date critique où le rôle des HSPGs comme corécepteur essentiel à l'activité de ce facteur de croissance fut mis en évidence [145-146], d'énormes efforts étaient consacrés à l'identification des motifs saccharidiques impliqués dans l'interaction et à la compréhension des mécanismes en jeu.

Une question essentielle soulevée à cette époque concernait le mode de fonctionnement de ce système à double récepteur (Figure 9). Yayon *et al.*, par analogie aux travaux sur l'AT-III, proposait que l'interaction aux HS provoquait un changement conformationnel du facteur de croissance conduisant à l'activation de son récepteur [146]. Cette hypothèse était soutenue par des travaux ayant montré que les HS n'étaient pas indispensables à l'interaction FGF-2/FGFR, mais augmentaient sensiblement l'affinité du récepteur pour son facteur de croissance [200]. Une autre proposition était que les HS pouvaient fixer simultanément deux molécules de FGF-2 et ainsi induire la formation d'un « pseudo-dimère ». Celui-ci pouvait alors en retour faciliter la dimérisation du FGFR, essentielle à la transduction de signal [201-203]. Enfin, la mise en évidence d'une interaction entre FGFR1 et HS [204] avait conduit à un troisième modèle, où les HS favorisaient et stabilisaient l'interaction FGF-2/FGFR en constituant un élément de liaison entre les deux partenaires.



**Figure 9 : Modèles hypothétiques d'activation du FGF-2 par les HS**

D'un point de vue structural, des travaux menés sur des HS de fibroblastes humains avaient conduit à l'isolation d'un motif de 14 unités saccharidiques (appelé oligo-H) de forte affinité pour le FGF-2 [205]. En parallèle, la séquence minimale d'interaction au facteur de croissance avait été définie comme étant un pentasaccharide [206]. Ces résultats, ainsi que des travaux réalisés à partir d'autres sources d'HS [207] ou d'héparine [208], démontraient l'importance des groupements 2-O-S et des résidus IdoA pour l'interaction. En revanche, le motif pentasaccharidique défini par Maccarana *et al.* ne permettait pas l'induction d'une réponse cellulaire [209-210], suggérant la nécessité de déterminants structuraux supplémentaires pour l'activité. La définition de ces critères constituait au début de ma thèse la source de débats extrêmement controversés. Tout d'abord, des oligosaccharides variant de l'hexa- au dodécasaccharide avaient été successivement reportés comme correspondant à la taille minimale nécessaire à la promotion de l'activité du FGF-2 [186, 202, 210-213]. Une étude très discutée à l'époque suggérait même une activation du facteur de croissance par des di- et trisaccharides non-sulfatés [214]. De même, l'hypothèse d'un rôle des 6-O-sulfates pour l'activité était tantôt évoquée [213, 215-216], tantôt contestée [210].

Dans ce contexte, mon projet de thèse visait à clarifier les déterminants saccharidiques requis pour l'activation du FGF-2. Pour ceci, nous avons développé une approche originale, basée sur la génération de banques d'oligosaccharides d'HS, le criblage de ces oligosaccharides sur un test de prolifération cellulaire afin de déterminer leur capacité à induire une réponse cellulaire au FGF-2, et la caractérisation structurale des échantillons d'intérêt par analyse de leur composition disaccharidique, en vue de mettre en évidence des relations structure/fonction.

## **2.2 *PREPARATION, CARACTERISATION STRUCTURALE ET CRIBLAGE FONCTIONNEL DE BANQUES D'OLIGOSACCHARIDES D'HS***

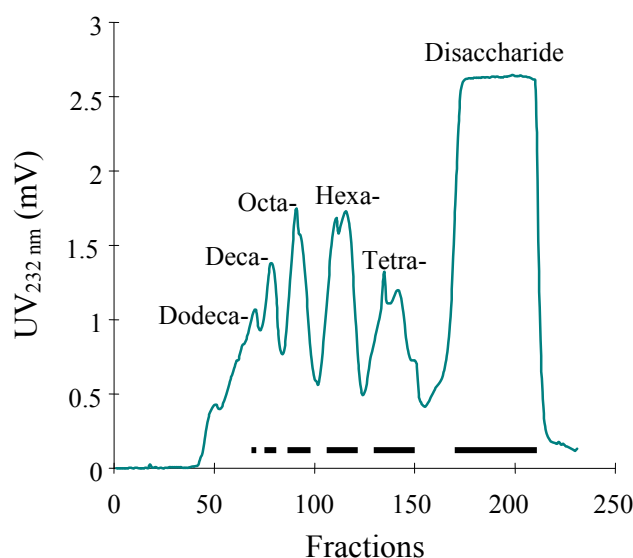
### **2.2.1 Génération d'une banque d'oligosaccharides d'HS**

Dans le cadre de ce projet, une première banque d'oligosaccharides fut réalisée à partir d'HS issus de muqueuse de porc, digérés de manière exhaustive par l'Héparinase III. Cette enzyme, qui clive spécifiquement le polysaccharide au niveau des GlcNAc, permettait en effet une digestion complète des domaines NAc et la libération de larges fragments de type « domaine

S ». A l'issue de cette digestion, les oligosaccharides produits ont alors été séparés en utilisant un protocole de purification en deux étapes : séparation en fonction de leur taille par chromatographie d'exclusion, puis séparation en fonction de leur charge sur colonne échangeuse d'anions.

### 2.2.1.1 Séparation des oligosaccharides en fonction de leur taille

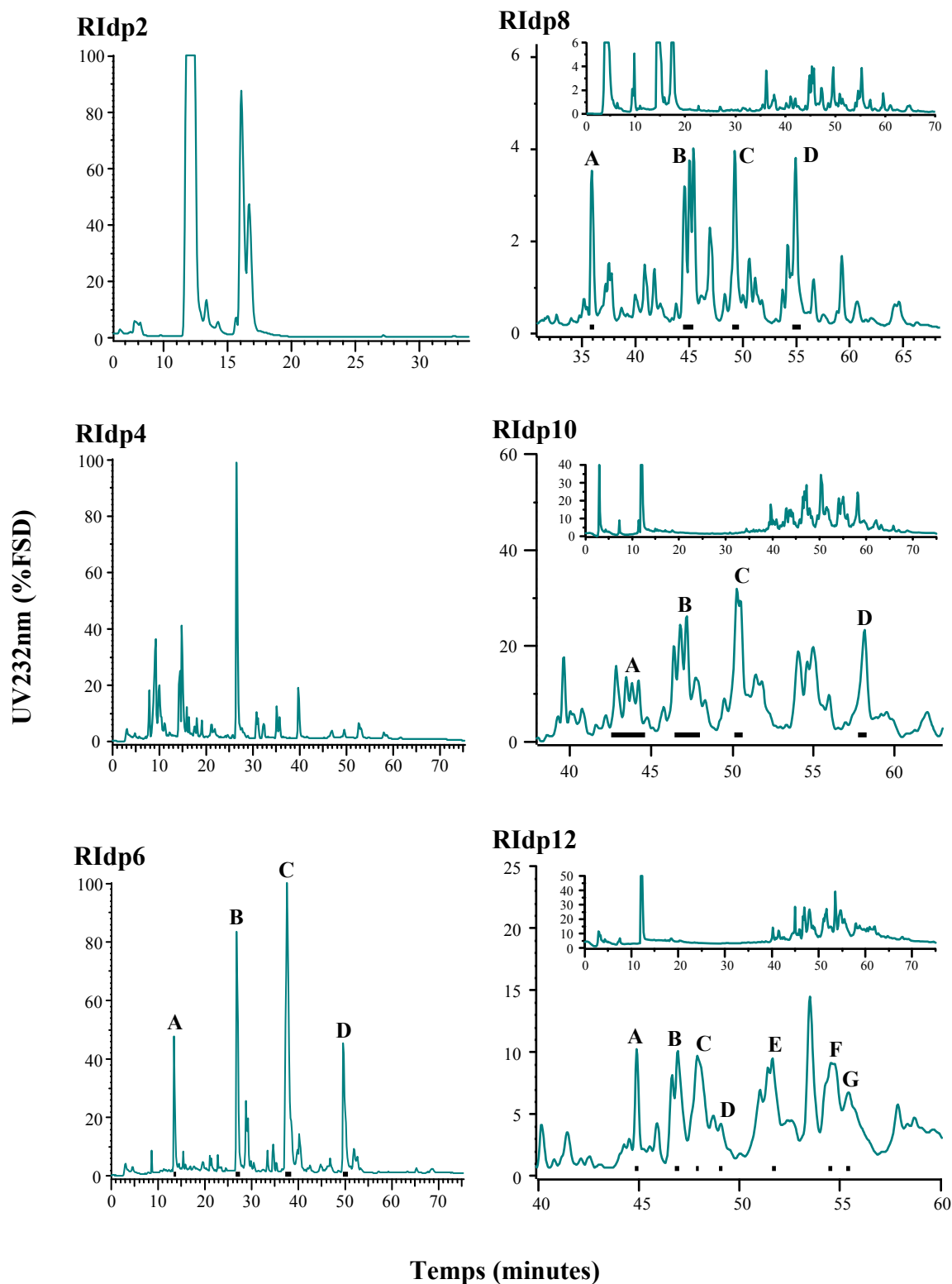
Cette première étape a été effectuée en utilisant une colonne de résine Bio-Gel P6 (Biorad) de grande dimension (170 x 1.5 cm, équilibrée en 0.5 M (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> à 6 ml/heure), conditions permettant la séparation avec une bonne résolution de fragments allant du disaccharide au dodécasaccharide.



**Figure 10 : Génération d'une banque d'oligosaccharides d'HS : séparation par la taille**

Chromatographie d'exclusion (Bio-Gel P6). Les fractions correspondant à chacun des pics de tailles définies ont été rassemblées comme indiqué ( — ).

Le profil obtenu est caractéristique d'un produit de digestion d'HS par l'héparinase III, avec un pic correspondant aux disaccharides fortement majoritaire. Afin d'éviter toute contamination par les espèces voisines, les fractions correspondant à l'apex de chacun des pics ont été rassemblées (voir Figure 10), puis soumises à plusieurs cycles de lyophilisation/reprise en H<sub>2</sub>O, afin d'éliminer toute trace de bicarbonate d'ammonium. L'homogénéité en taille de chacun des échantillons a alors été vérifiée par chromatographie d'exclusion en HPLC (utilisation de 3 colonnes TSK3000SW montées en série).



**Figure 11 : Génération d'une banque d'oligosaccharides d'HS : séparation par la charge**

Séparation des di-, tétra-, octa-, déca- et dodécasaccharides d'HS sur colonne Propac PA1 (SAX-HPLC) équilibrée en H<sub>2</sub>O, pH 3.0 à un débit de 1 ml/min, après application d'un gradient de 0.04-1.5 M NaCl (pour les RIdp2, -4 et -6) et de 0.04-2 M NaCl (pour les RIdp8, -10 et -12). Les fractions correspondant à chacun des pics d'intérêt ont été rassemblées comme indiqué ( — ).



### 2.2.1.2 Séparation des oligosaccharides en fonction de leur charge

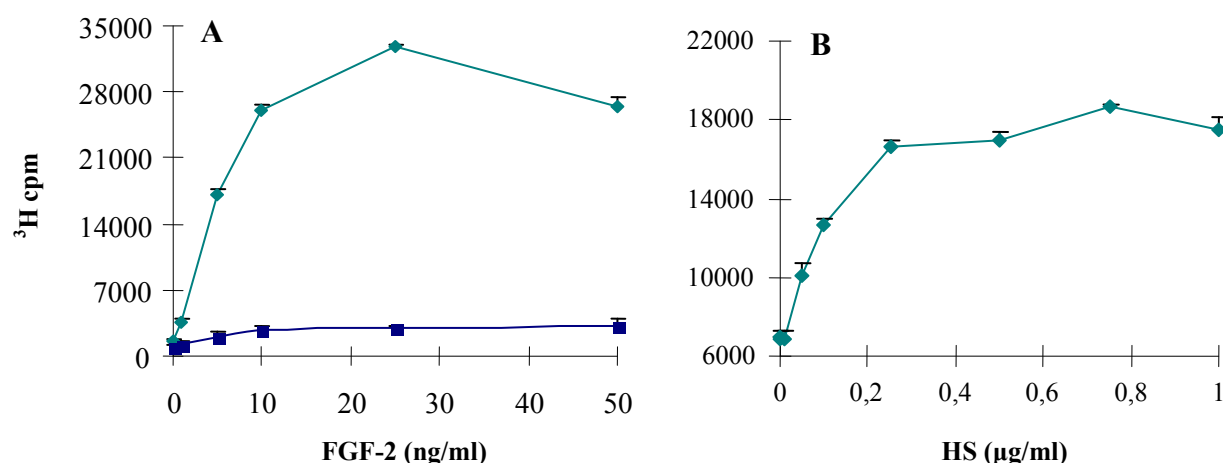
Les différents fragments de taille définie ont alors été séparés en fonction de leur charge par chromatographie échangeuse d'ions, au moyen d'une colonne Propac PA1 (Dionex) montée sur un système HPLC (*strong anion exchange* SAX-HPLC). Pour chacun des échantillons, les conditions d'élution (gradients de NaCl) ont été préalablement optimisées afin de permettre une résolution optimale. La Figure 11 montre des profils caractéristiques obtenus pour les di-, tétra-, hexa- octa-, déca- et dodécasaccharides.

Comme attendu, les profils d'élution diffèrent d'un échantillon à l'autre, le niveau d'hétérogénéité et de complexité augmentant avec la longueur des fragments séparés. Ainsi, les disaccharides comprennent une espèce majoritaire et 2 espèces minoritaires, alors que 4 pics principaux peuvent être observés pour la séparation des hexasaccharides et que plus de 17 espèces principales sont détectées dans l'échantillon des dodécasaccharides. En tout, plus d'une centaine de structures saccharidiques ont pu être clairement identifiées dans les différentes préparations. Parmi elles, il a été choisi de rassembler certains pics ou groupes de pics au sein d'un même échantillon, afin de simplifier les études ultérieures (voir Figure 11).

### 2.2.2 Propriétés fonctionnelles des oligosaccharides d'HS vis-à-vis du FGF-2

Une fois réalisée, la banque d'oligosaccharides a été criblée sur un modèle cellulaire de réponse au FGF-2. Ce modèle est basé sur l'utilisation de la lignée cellulaire BAF-32, qui sont des cellules pré-lymphoïdes de souris dépendantes de l'interleukine-3 (IL-3), transfectées avec le FGFR-IIIc et dépourvues d'HS à leur surface cellulaire [202]. En absence d'IL-3, la prolifération peut être restaurée par le FGF-2 si une source exogène d'HS, d'héparine ou d'un oligosaccharide approprié est ajoutée au milieu de culture. Dans le test mis en place, la prolifération cellulaire est suivie par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée. Les conditions expérimentales (temps d'incubation, concentrations en facteurs de croissance, GAGs, [<sup>3</sup>H]thymidine...) ont été établies en utilisant des chaînes d'HS entières comme contrôle positif (Figure 12). Il peut ainsi être observé qu'en absence de GAGs, le FGF-2 présente une activité mitogène très réduite, et que l'addition de GAGs dans le milieu de culture potentialise cet effet de façon très marquée (jusqu'à 15 fois le taux d'incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine) et ce, à des concentrations très faibles (EC<sub>50</sub> ~100 ng/ml). En fonction de ces

résultats, le criblage de la banque oligosaccharidique a été effectué à une concentration sub-optimale en FGF-2 de 10 ng/ml, concentration permettant l'observation d'un effet maximum sur la prolifération dès 250 ng/ml d'HS, sans effet inhibiteur significatif jusqu'à des concentrations de 1 µg/ml de polysaccharide. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle positif (incorporation de [ $^3$ H]thymidine après ajout de FGF-2 et de 1 µg/ml de chaînes d'HS entières), après soustraction du contrôle négatif (addition de FGF-2 seul).



**Figure 12 : Induction de la prolifération des cellules BAF-32 par le FGF-2 et les HS**

**A:** prolifération cellulaire induite par des concentrations croissantes de FGF-2 en présence (—◆—) ou en absence (—■—) d'HS (1 µg/ml).

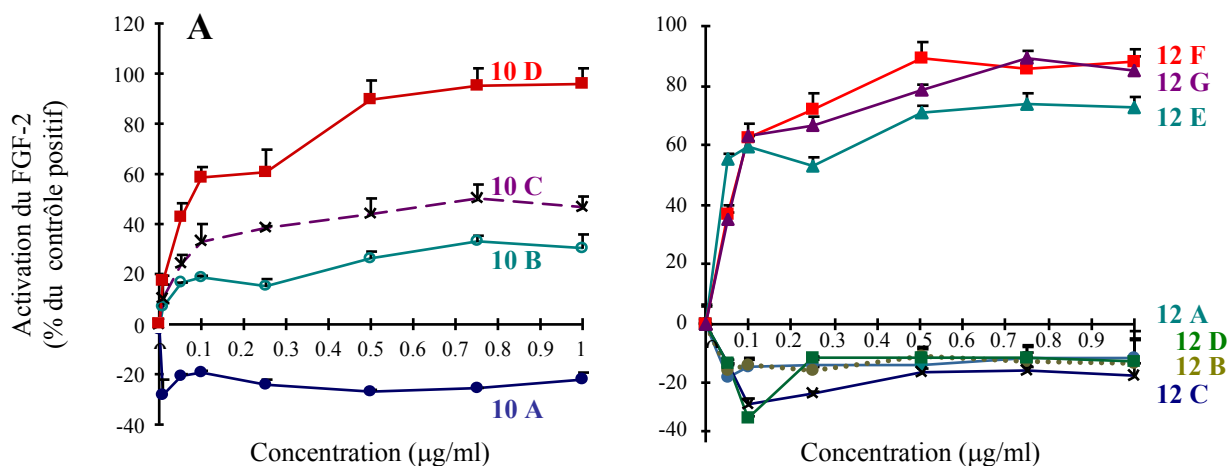
**B:** prolifération cellulaire induite par le FGF-2 (10 ng/ml), en présence de concentrations croissantes d'HS.

Le niveau d'incorporation de tritium observé en absence d'HS représente l'activité mitogène basale du FGF-2 seul.

Les résultats obtenus pour les échantillons de la banque oligosaccharidique ont tout d'abord montré l'incapacité des fragments d'HS les plus courts (di- à octasaccharides) à activer le FGF-2, celle-ci nécessitant donc un motif oligosaccharidique d'au moins 10 résidus de long. Les données obtenues pour ces échantillons (déca- et dodécasaccharides) sont présentées Figure 13.

Le criblage des décasaccharides montre clairement l'existence d'espèces avec des propriétés fonctionnelles très distinctes (Figure 13A). Ainsi, RI<sub>dp</sub>10D stimule le facteur de croissance de façon très forte, avec un maximum d'activation atteignant presque le niveau de celui obtenu avec des chaînes d'HS entières (~90% du contrôle positif), alors que les espèces RI<sub>dp</sub>B et -C ne conduisent qu'à une activation modérée (30 et 50% du contrôle positif, respectivement). A

l'inverse, RI<sub>dp</sub>10A ne présente aucun effet promoteur et inhibe même le niveau de prolifération basal induit par le facteur de croissance seul. Il est également intéressant de noter que la capacité d'activation des différents oligosaccharides est corrélée avec leur temps d'élution en chromatographie échangeuse d'ions (Figure 11), et donc avec leur charge.



**Figure 13 : Activation du FGF-2 par les oligosaccharides RI<sub>dp</sub>10s et RI<sub>dp</sub>12s**

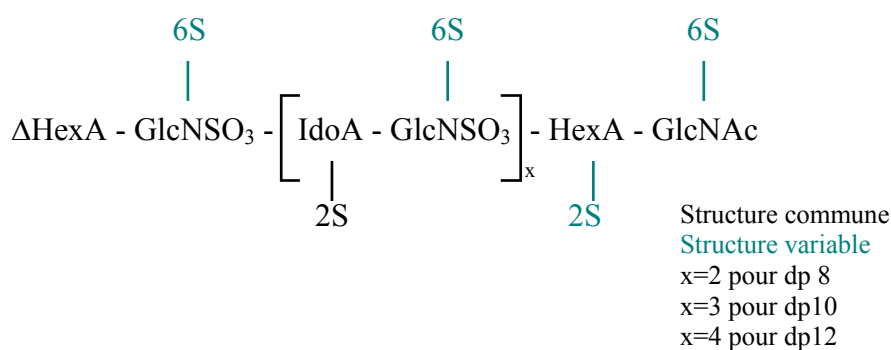
La prolifération cellulaire est induite par addition de FGF-2 (10 ng/ml), en présence de concentrations croissantes des différents oligosaccharides RI<sub>dp</sub>10s (A) et RI<sub>dp</sub>12s (B). Les résultats sont exprimés en pourcentages du contrôle positif (prolifération induite par addition de FGF-2 en présence de 1 µg/ml de chaînes d'HS intactes), après soustraction du contrôle négatif (prolifération induite par le FGF-2 seul).

Pour les dodécasaccharides, les données obtenues montrent des profils d'activation nettement plus tranchés (Figure 13B). En effet, les oligosaccharides testés se séparent en deux sous-populations distinctes d'espèces non-stimulatrices (RI<sub>dp</sub>12A, -B, -C, -D) ou fortement stimulatrices (RI<sub>dp</sub>12E, -F et -G). Pour ces dernières, l'induction de la réponse au FGF-2 est très forte, même à faible concentration (50% d'activation atteints pour des concentrations d'~50 ng/ml) et conduit à des niveaux d'activation maximaux relativement similaires (70% d'activation pour RI<sub>dp</sub>12E, plus de 90% pour RI<sub>dp</sub>12F et -G). Ces résultats sont en net contraste avec ceux obtenus pour les décasaccharides, qui se caractérisent par une forte corrélation linéaire entre charge et activité. En effet et de manière tout à fait intéressante, pour les dodécasaccharides, un effet de seuil particulièrement marqué peut être observé, indiquant un niveau de sulfatation critique pour permettre le passage d'une espèce inhibitrice (RI<sub>dp</sub>12D) à une espèce activatrice (RI<sub>dp</sub>12E). En dessous de ce niveau, l'augmentation du degré de charge (observé entre les échantillons RI<sub>dp</sub>12A et -D) n'a aucune conséquence

fonctionnelle. De la même manière, une fois ce niveau critique atteint, la sous-population de dodécasaccharides actifs montre des potentiels de stimulation du FGF-2 relativement similaires, malgré des différences de charge significatives.

### 2.2.3 Analyse disaccharidique des oligosaccharides d'HS

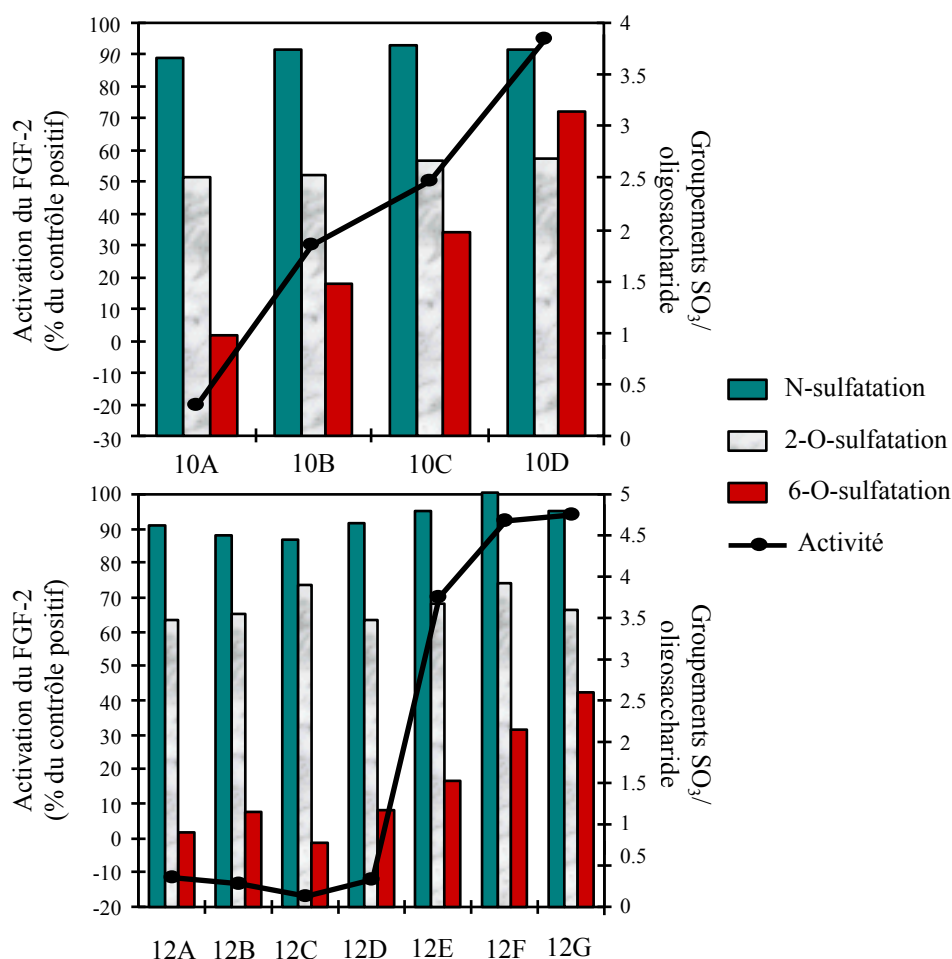
Les différents échantillons de notre banque oligosaccharidique ont été structuralement définis par détermination de leur composition disaccharidique. Cette analyse a été réalisée par dépolymérisation exhaustive de nos échantillons au moyen d'un cocktail d'enzymes (héparinases I, II et III) et analyse des produits de digestion en SAX-HPLC, suivant un gradient préalablement calibré avec des disaccharides standards. Les résultats obtenus pour les octa-, déca- et dodécasaccharides montrent que toutes les espèces de la banque sont particulièrement enrichies en disaccharides N- et 2-O-sulfatés, mais présentent des taux de 6-sulfatation extrêmement différents. En prenant en compte la spécificité de clivage de l'héparinase III (coupure au niveau des glucosamines N-acétylées) utilisée pour générer la banque, ces informations nous ont permis de définir un modèle structural commun aux espèces de notre banque. Cette structure comprend une région centrale composée d'une succession de disaccharides [DHexA,2S – GlcNS], la variabilité étant principalement due au nombre et au positionnement des groupements 6-O-sulfate sur le motif saccharidique (Figure 14).



**Figure 14 : Modèle structural des oligosaccharides de la banque d'HS**

Ces résultats ont ensuite été mis en parallèle avec les données fonctionnelles obtenues afin de mettre en évidence d'éventuelles relations structure/fonction (Figure 15). Ainsi, la comparaison entre le degré de sulfatation des déca- et dodécasaccharides et leur capacité à

activer le FGF-2 met en évidence une claire corrélation entre activité et nombre de groupements 6-O-sulfate, soulignant donc l'importance de ce type de sulfatation pour la stimulation du facteur de croissance. De manière intéressante, alors que l'analyse des décasaccharides montre une augmentation linéaire de l'activité avec le taux de 6-O-sulfatation, les résultats obtenus pour les dodécasaccharides se caractérisent par un effet seuil très marqué, où une légère augmentation dans le degré de 6-O-sulfatation différencie la fraction inhibitrice RI<sub>dp</sub>12D du stimulateur le plus fort RI<sub>dp</sub>12E. Ceci suggère que la capacité d'activation du FGF-2 nécessite la présence d'un nombre limité de groupements 6-O-sulfate (1 à 2), mais que leur positionnement joue très probablement un rôle important.

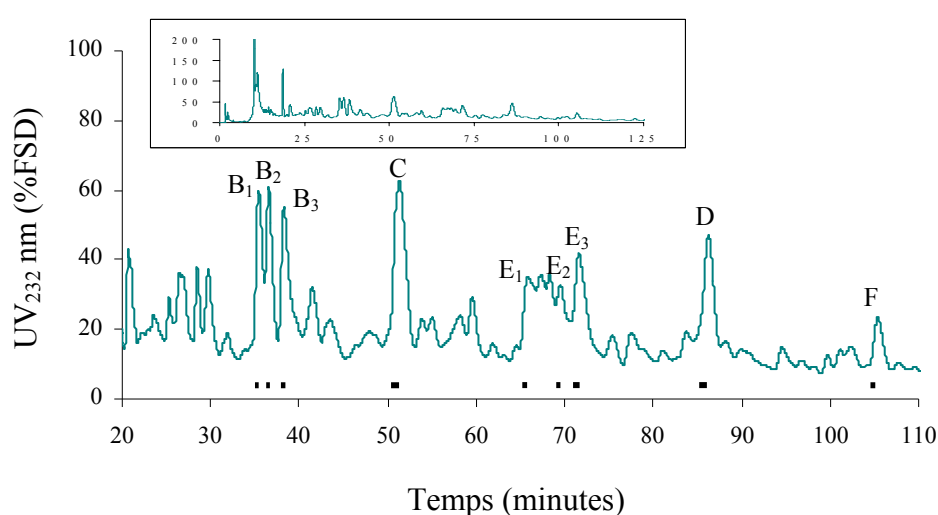


**Figure 15 : Relations structure/fonction : corrélation entre sulfatation et capacité d'activation du FGF-2**

## 2.2.4 Préparation d'une deuxième banque de décasaccharides d'HS

Les résultats obtenus par le criblage de notre première banque oligosaccharidique ont fourni des informations importantes sur les caractéristiques structurales requises pour l'activation du FGF-2. Cependant, les niveaux de pureté d'échantillon atteints lors de la préparation de cette banque ne pouvaient pas permettre la séparation de fragments présentant des variations structurales fines, ceci constituant une limitation claire à l'approche.

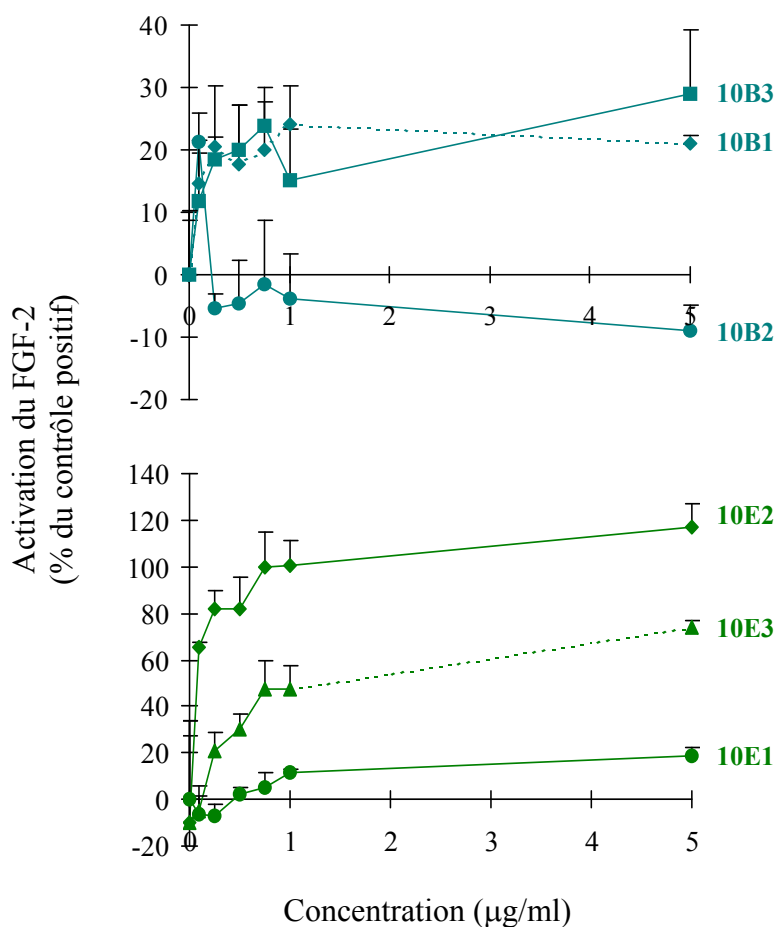
Nous nous sommes donc attachés à préparer une deuxième banque d'oligosaccharides. Nos efforts se sont alors portés uniquement sur les décasaccharides, taille de fragment minimale pour promouvoir une réponse au FGF-2, avec pour objectif de séparer les différentes espèces oligosaccharidiques avec une efficacité accrue. Pour cela, les conditions de gradient ont été encore optimisées et la quantité de matériel chargé par injection réduit. Le profil de séparation obtenu suivant ces nouvelles conditions demeure très similaire au précédent, mais une amélioration significative de la résolution des pics a pu être observée. (Figure 16). Ainsi, certains groupes de pics qui avaient été rassemblés au sein d'un même échantillon dans la première banque ont pu être séparés en différentes sous-espèces. Par exemple, les fractions RIIdp10B1, -B2 et -B3 correspondent aux 3 pics principaux du groupe de pics formant l'échantillon RIIdp10B de la première banque.



**Figure 16 : Purification par SAX-HPLC des oligosaccharides RIIdp10s**

Séparation des décasaccharides d'HS sur colonne Propac PA1 (SAX-HPLC) équilibrée en H<sub>2</sub>O, pH3.5 à 1 ml/min, après application d'un gradient de 0.6-1 M NaCl sur 2 heures. Les fractions correspondant à chacun des pics d'intérêt ont été rassemblées comme indiqué (■).

Cette nouvelle banque de décasaccharides a ensuite été testée pour sa capacité à activer le FGF-2. Les échantillons RIIdp10C et -D provenant de pics bien isolés ont montré des capacités d'activation très comparables à celles observées pour la première banque. En revanche, l'analyse des échantillons issus de groupes de pics tels que les espèces RIIdp10B1, -2 et -B3 d'une part, et RIIdp10E1, -E2 et -E3 d'autre part, ont fourni des informations particulièrement intéressantes.



**Figure 17 : Activation du FGF-2 par les oligosaccharides RIIdp10Bs et -Es**

En effet, les résultats montrent que les différentes sous-espèces de ces deux familles de pics présentent des niveaux d'activité très distincts. Ainsi, les fractions RIIdp10B1 et -B3 ont des capacités d'activation du FGF-2 relativement similaires, alors que RIIdp10B2 est un inhibiteur du facteur de croissance. De façon encore plus remarquable, la sous-espèce RIIdp10E1 active le FGF-2 de manière très modeste (19% du contrôle positif), en comparaison avec des espèces moins sulfatées telles que RIIdp10B3 et RIIdp10C (29 et 38%

du contrôle positif, respectivement). A l'inverse, RIIdp10E2 s'est révélé être l'espèce décasaccharidique la plus activatrice testée (117% du contrôle positif), un niveau bien supérieur à l'espèce la plus sulfatée de cette banque (RIIdp10F, activant à 73% du contrôle positif).

Ces résultats sont particulièrement importants, car même si des analyses disaccharidiques n'ont pas pu être réalisées sur ces échantillons (par manque de matériel), les temps d'élution très rapprochés séparant les différentes sous-espèces d'une même famille (à savoir les RIIdp10Bs et -Es) suggèrent une différence dans le positionnement des charges plutôt que dans le nombre de charges présentes. La variabilité au sein de ces échantillons étant principalement liée à la 6-O-sulfatation, ces données soulignent donc l'existence de différences fonctionnelles profondes associables à des profils de 6-O-sulfatation précis.

## **2.3 DISCUSSION : QU'AVONS-NOUS APPRIS ?**

### **2.3.1 Impact de ces travaux**

Le FGF-2 est un facteur de croissance majeur, impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Son activité est contrôlée par un grand nombre de processus régulatoires et la transduction de signaux induisant une réponse cellulaire est dépendante de son interaction avec son récepteur primaire : le FGFR. En 1991, les recherches dans ce domaine prennent un nouveau virage, avec la découverte que les HSPGs jouent un rôle de corécepteur du FGF-2, indispensable à son activité [145-146]. Dès lors, et dans un contexte succédant à l'identification du pentasaccharide fixateur de l'AT-III, des efforts considérables vont être mis en œuvre afin de caractériser le motif d'HS responsable de l'activation du FGF-2. Cependant, les recherches menées se sont avérées extrêmement difficiles et ont abouti à des résultats souvent contradictoires et controversés. A contre-pied des démarches classiquement utilisées, visant à sélectionner des motifs saccharidiques par chromatographie d'affinité au FGF-2, nous avons décidé d'adopter une approche plus systématique, basée sur la préparation d'une banque de structures la plus variée et exhaustive que possible, et le criblage de cette banque sur un modèle de prolifération cellulaire induit par le FGF-2. Cette approche nous a permis de clarifier un certain nombre de caractéristiques saccharidiques importantes pour l'activation de



ce facteur de croissance et d'apporter de nouveaux arguments dans le débat sur les mécanismes impliqués.

Nous avons tout d'abord pu déterminer que le motif saccharidique minimal permettant l'activation du FGF-2 est un décasaccharide. Aucun des fragments plus courts testés n'a montré de capacité à stimuler le facteur de croissance, y compris des octasaccharides fortement sulfatés, tels que RI<sub>dp</sub>8D. En revanche, certains de ces fragments courts (hexa- et octasaccharides) étaient inhibiteurs de l'activité (D. Pye, communication personnelle). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'un découplage entre structures permettant la fixation du facteur de croissance (impliquant des motifs relativement courts, tels qu'un hexasaccharide) et celles permettant son activation (motifs d'au moins 10 unités saccharidiques de long). Nous avons également identifié, et ce pour la première fois, des oligosaccharides longs (déca- et dodécasaccharides) capables d'inhiber le FGF-2. Ceci indique que si la taille est un paramètre important pour discriminer propriétés d'interaction et d'activation, d'autres paramètres structuraux entrent également en jeu.

Dans ce cadre, nous avons montré que la 6-O-sulfatation des HS était une caractéristique structurale essentielle à l'activité. Ceci est en accord avec de précédents travaux [213, 215], mais nos résultats indiquent par ailleurs que ces propriétés sont dépendantes de profils de 6-O-sulfatation particuliers. En effet, nous avons pu isoler des espèces oligosaccharidiques présentant des taux de sulfatation relativement proches mais des capacités d'activation très différentes. Bien que nous n'ayons pas pu définir précisément la structure du motif minimal capable de promouvoir une réponse au FGF-2, nos données suggèrent qu'un nombre limité (1 à 2) de groupements 6-O-sulfate situés dans des positions précises devrait être suffisant pour définir un motif activateur.

Une autre question extrêmement controversée concernait le mécanisme d'action par lequel les HS induisaient une réponse cellulaire au FGF-2. Parmi les hypothèses émises, il était suggéré que la fixation aux HS pouvait induire un changement conformationnel du facteur de croissance conduisant à son activation, que les HS favorisaient la dimérisation du FGF-2 et que le dimère représentait l'unité fonctionnelle reconnue par le FGFR, ou encore que les HS pouvaient interagir simultanément avec le facteur de croissance et son récepteur et ainsi permettre la formation d'un complexe ternaire fonctionnel (Figure 9). La première hypothèse a été rapidement remise en cause par des études structurales de complexes FGF-2/héparine

qui ne permirent pas de mettre en évidence de changements conformationnels de la protéine [217-218]. En revanche, les deux autres modèles justifiaient la nécessité de fragments plus longs pour l'activité : soit pour permettre la fixation de 2 molécules de FGF-2 (2 sites identiques ?), soit pour accommoder 2 sites d'interaction distincts pour le facteur de croissance et son récepteur. Des études avaient par ailleurs montré que la fixation des HS au FGF-2 était dépendante de la N- et 2-O-sulfatation du polysaccharide, mais pas de la 6-O-sulfatation [205-206, 217]. Nos travaux présentent donc la 6-O-sulfatation comme une nouvelle spécificité structurale (autre que la taille) permettant de discriminer propriétés d'interaction et propriétés d'activation. Ceux-ci sont donc en faveur de l'existence d'un motif saccharidique asymétrique, constitué d'un fragment de 6-8 résidus riches en N- et 2-O-sulfates et permettant une fixation de haute affinité avec le FGF-2, et d'une extension présentant des groupements 6-O-sulfates établissant une interaction avec le FGFR. L'existence de contacts HS/FGFR dépendants de groupements 6-O-sulfates a depuis été confirmée par d'autres études [190, 219].

Enfin, une importante partie de mes travaux (non détaillée dans ce manuscrit) a également consisté à explorer les propriétés fonctionnelles des éléments de notre banque oligosaccharidique avec un autre membre de la famille des FGFs, le FGF-1. Les résultats obtenus ont montré de nombreuses différences entre les caractéristiques structurales requises pour l'activation de ces deux facteurs de croissance. La réponse au FGF-1 peut être induite par des fragments plus courts (des octasaccharides), une importance des groupements 6-O-sulfate a également été observée, mais d'autres types de sulfatation (comme la 2-O-sulfatation) semblent aussi jouer un rôle majeur dans le processus. Une fois encore, des données structurales plus précises non pas pu être obtenues. Néanmoins, nos travaux démontrent l'existence de spécificités structurales distinctes pour des ligands différents, y compris pour des facteurs de croissance d'une même famille.

### **2.3.2 Quels progrès depuis ?**

Vers la fin de ma thèse, les différents travaux effectués sur l'interaction du FGF avec les HS semblaient enfin converger et fournir des éléments de réponse quant aux mécanismes d'actions sous-jacents, jusqu'à la publication de deux structures de complexes ternaires FGF/FGFR/héparine résolues par cristallographie aux rayons X [219-220]. Ces modèles

suggèrent tous deux une dimérisation du facteur de croissance et de son récepteur, indiquent la présence de contacts entre tous les partenaires (et donc une interaction FGFR/héparine) et présentent de grandes similitudes dans l'organisation du complexe FGF/FGFR/héparine. Cependant, ils diffèrent de manière drastique sur la façon dont les deux molécules de FGFs et de FGFRs s'assemblent pour former le complexe ternaire. Pellegrini *et al.* proposent un modèle d'interaction FGF/FGFR/héparine asymétrique de stœchiométrie 2:2:1 [221]. Dans ce modèle, les deux demi-complexes FGF/FGFR n'établissent pas d'interactions directes entre eux et l'héparine joue un rôle central et essentiel à leur association. A l'inverse, Schlessinger *et al.* décrivent un modèle symétrique de stœchiométrie 2:2:2, dans lequel les dimères FGF/FGFR s'assemblent *via* des interactions principalement de type protéine/protéine et où le polysaccharide stabilise le complexe en s'opposant aux répulsions électrostatiques [219]. Dans un contexte physiologique, le modèle asymétrique supporte la formation de complexes fonctionnels au niveau de régions internes des chaînes d'HS, mais repose sur la possibilité de voir deux demi-complexes FGF/FGFR venir s'aligner sur la face opposée d'un même motif saccharidique, phénomène qui pourrait être favorisé par l'induction de changements conformationnels localisés du polysaccharide [222]. Le modèle symétrique, lui, suggère la contribution de deux chaînes d'HS indépendantes pour la formation de ces complexes à la surface cellulaire. Ceci implique donc l'assemblage des complexes au niveau des extrémités non-réductrices des chaînes d'HS.

La résolution de ces structures mettait donc en lumière un niveau de complexité bien supérieur dans les voies de signalisation des FGFs et a donné une nouvelle impulsion à l'étude des HS dans ces mécanismes. Dix ans plus tard, la controverse entre ces deux modèles n'est toujours pas résolue. Il est cependant important de noter que ces deux structures furent réalisées à partir de molécules de FGF et de FGFR différentes : un complexe FGF-1/FGFR-2 dans le cas du modèle de Pellegrini, et un complexe FGF-2/FGFR-1 pour celui de Schlessinger, et que nos travaux ainsi que d'autres publiés depuis suggèrent des spécificités saccharidiques propres à un FGF ou à un complexe FGF/FGFR donné [187, 191-192, 223]. Par ailleurs, des études ont également suggéré que des oligosaccharides d'héparine courts (tétra- et hexasaccharides) pouvaient induire un certain degré de signalisation, bien qu'à des niveaux bien moindres que ceux observés avec des chaînes polysaccharidiques entières ou de longs oligosaccharides [224-225]. Une hypothèse assez pertinente serait donc l'existence de différents modes de signalisation *via* le FGF-2, induits par des complexes FGF/FGFR/HS présentant des architectures distinctes en fonction de la structure saccharidique engagée [225].

Cependant, malgré l'abondance de travaux et les incontestables progrès réalisés dans ce domaine, les mécanismes précis intervenant dans la promotion de la réponse au FGF par les HS demeurent encore aujourd'hui à élucider.

### **3 LE PRESENT : ROLE DES GAGS DANS LES RELATIONS HÔTE-PATHOGENES ET LES PROCESSUS INFLAMMATOIRES**

Ma rencontre avec Hugues Lortat-Jacob remonte à 1997, lors d'une visite qu'il rendait à John Gallagher avec qui il avait collaboré dans le cadre de ses travaux sur l'interaction IFN $\gamma$ /HS. Nous nous sommes ensuite revus en 1999, durant le congrès « Protéoglycanes » de Stockholm. A cette époque, j'arrivais à la fin de ma thèse et j'étais déterminé à poursuivre ma carrière dans le domaine des GAGs. Hugues, de son côté, s'était installé depuis peu à l'IBS et cherchait à développer son équipe sur cette thématique. C'est ainsi que je suis arrivé en tant que post-doctorant à l'IBS, en août 2000, pour travailler sur le rôle des HS au cours de l'infection par le VIH. J'entrais dès lors dans le domaine tout nouveau pour moi des relations hôtes/pathogènes.

La recherche à l'IBS, telle qu'elle s'organise aujourd'hui, s'articule autour de quatre grands axes : la division cellulaire, les limites du vivant, l'étude des protéines membranaires et l'Immunité et les interactions Hôte/pathogène (I2HP). C'est dans ce dernier axe que s'inscrivent les thématiques de recherche de l'équipe du LEM-GAG, dans laquelle je poursuis mes travaux, et qui vise à étudier le rôle des GAGs dans les processus inflammatoires et les interactions avec les pathogènes.

Une grande partie de mes recherches durant ces 10 dernières années a été consacrée à l'étude de l'interaction des HS avec la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH, sujet pour lequel j'ai obtenu une bourse post-doctorale de l'ANRS à mon arrivée à l'IBS en 2000, puis un poste de chargé de recherche au CNRS en 2002. C'est également sur ce projet que j'ai pu co-encadrer la thèse d'Elodie Crublet, de fin 2003 à début 2008. L'ensemble de ces travaux est détaillé dans le chapitre suivant, ainsi que ceux que j'ai réalisés sur l'adénovirus de type 3 et la chimiokine Rantes. D'autres études que j'ai effectuées durant cette période, notamment sur le facteur de transcription Zebra de l'EBV [226], la métalloprotéinase ADAM-12 [227] et les protéines C1q [228] et C1i [229] de l'immunité innée ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

### **3.1 RÔLE DES HS AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH**

L'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) se traduit par une déplétion des lignées lymphocytaires CD4<sup>+</sup>, et conduit à des états cliniques avancés, généralement fatals, connus sous le nom de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). L'attachement du virus sur la cellule hôte est une étape essentielle de son cycle infectieux. Au cours des quinze dernières années, ces mécanismes se sont considérablement clarifiés et les partenaires moléculaires impliqués sont maintenant bien définis [230-232].

Du côté du virus, la glycoprotéine d'enveloppe gp120 constitue la « clef de voûte » du processus d'interaction virus/cellules. Cette protéine, trouvée à la surface du virus en association avec la glycoprotéine gp41 se caractérise par une structure extrêmement complexe. Elle est en effet composée d'un core protéique constitué par un domaine interne et un domaine externe relié entre eux par un feuillet intermédiaire, le « *bridging sheet* », relativement peu structuré. A sa surface se trouvent 5 boucles (V1-V5) flexibles de séquences hypervariables selon les souches virales, et de très nombreuses glycosylations (contribuant pour plus de 50% au poids moléculaire de la protéine) jouant un rôle important dans la structuration de la protéine et dans l'évasion à la réponse immunitaire. L'attachement du VIH débute par la fixation de gp120 sur une glycoprotéine transmembranaire de la cellule hôte, CD4. Cette interaction provoque d'importantes modifications conformationnelles de gp120, telles que le déplacement des boucles V1/V2 et V3, et la structuration du feuillet intermédiaire pour aboutir à la formation d'un épitope particulier dit CD4 induit (CD4i). CD4i constitue un deuxième site de fixation, reconnu par certains membres de la famille des récepteurs des chimiokines (principalement CXCR4 et CCR5), qui vont jouer un rôle de corécepteur de gp120 à la surface cellulaire. Cette deuxième interaction provoque alors une réorganisation des protéines d'enveloppe du virus et l'exposition de la protéine gp41 qui, de par ses propriétés fusogènes, va diriger la fusion des membranes virales et cellulaires. L'utilisation sélective de l'un ou l'autre des corécepteurs définit le tropisme viral, les virus dits X4 (utilisant le corécepteur CXCR4) infectant préférentiellement les lymphocytes T, alors que les virus R5 (utilisateurs du corécepteur CCR5) ciblent les monocytes et les macrophages.

En plus de ses récepteurs cellulaires, le VIH est également capable de se fixer à d'autres molécules présentes sur les cellules qu'il infecte, telles que DC-SIGN, les sphingolipides ou

encore les HS. Les rôles multiples joués par ces polysaccharides dans les relations Hôte-pathogènes, et notamment dans l'infection par le VIH, sont désormais bien documentés (voir paragraphe 1.4.1.5). En plus de servir de récepteurs d'attachement permettant au virus de se concentrer à proximité de ses récepteurs d'entrée, les HS fixent et protègent le virus en le gardant à l'état infectieux pendant plusieurs jours [163]. Ils interviennent dans le passage du virus au travers de l'épithélium des muqueuses et de la barrière hémato-encéphalique par transcytose [165, 168, 170]. Enfin, ils permettent le transfert du virus de la surface de cellules non permissives vers celle de cellules permissives et contribuent ainsi à un mode d'infection dit *en trans* [163-164].

Lorsque j'ai débuté mon stage post-doctoral à l'IBS, il avait déjà été montré que la fixation du VIH aux HS s'effectuait *via* la glycoprotéine gp120, au niveau de la boucle V3 de la protéine [233]. Cependant, les aspects structuraux et fonctionnels impliqués demeuraient très mal définis. Une étude menée peu avant mon arrivée par l'équipe de Fernando Arenzana Seisdedos (Institut Pasteur, Paris) en collaboration avec Hugues avait toutefois montré que cette interaction reposait largement sur le potentiel électrostatique la boucle V3, mais dépendait également de déterminants structuraux précis. En effet, des différences très minimes dans la séquence de la boucle V3 sans variation significative de la charge nette pouvaient moduler très fortement l'affinité du virus pour les HS. Ces travaux suggéraient par ailleurs que des motifs extérieurs à la boucle V3 devaient également être impliqués [234]. L'objectif de mon projet de recherche consistait donc à clarifier les mécanismes d'interaction gp120/HS et à identifier précisément les déterminants structuraux impliqués en vue d'obtenir des informations nouvelles sur le rôle de ces polysaccharides au cours de l'infection par le VIH.

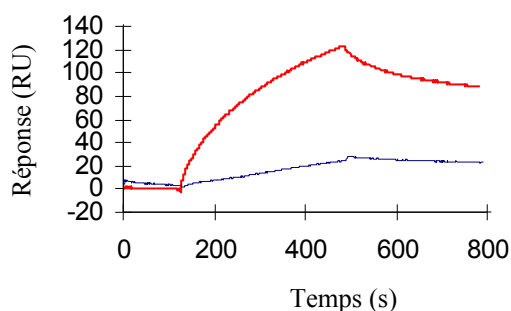
### **3.1.1 Etude de l'interaction gp120/HS par résonance plasmonique de surface**

Dans un premier temps, mes travaux ont visé à caractériser de façon plus précise l'interaction gp120/HS en utilisant la technologie de résonance plasmonique de surface (système BIAcore). Grâce à cette technique, nous avons pu effectuer des mesures d'interaction en temps réel de molécules de gp120 recombinante (obtenues par collaboration avec Dr Q. Sattentau, Oxford) sur des chaînes d'HS ou d'héparine couplées à la surface du biocapteur.

Les résultats obtenus nous ont permis d'aboutir à 3 observations principales, qui ont été déterminantes pour la poursuite de ce projet.

#### *3.1.1.1 La capacité d'interaction avec les HS est liée au tropisme viral*

Nous avons tout d'abord cherché à analyser l'interaction des HS avec des gp120 issues de différents isolats viraux. Les résultats obtenus ont montré que les gp120 de virus de tropisme X4 se fixaient fortement sur la surface d'héparine, alors que les gp120 de type R5 n'interagissaient pas avec le polysaccharide (Figure 18).



**Figure 18 : Analyse en BIAcore de l'interaction de gp120 sur une surface d'héparine**

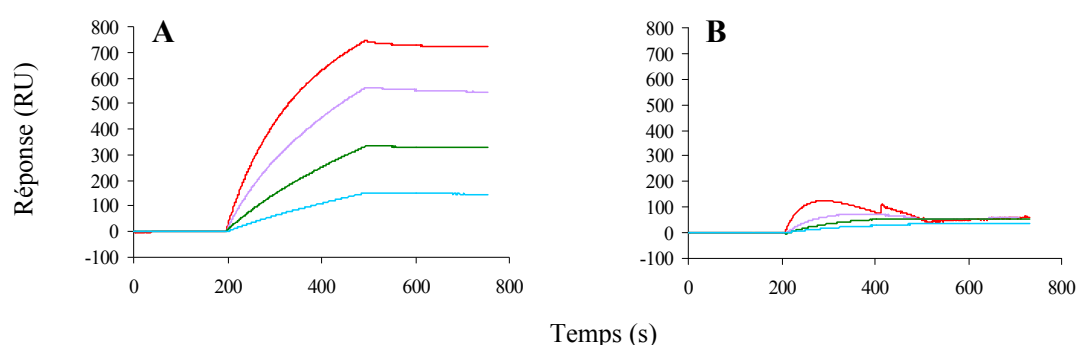
Interaction de gp120 de type X4 (HxBc2, courbe rouge) ou R5 (Jrfl, courbe bleue) sur une surface d'héparine. Les différents sensorgrammes ont été obtenus par injection de 60 nM de chaque protéine.

Il existe donc une corrélation directe entre capacité de fixation aux HS et tropisme viral. Un grand nombre de critères différencient les virus de types X4 et R5, notamment le type de cellules qu'ils infectent, leur pathogénicité et leur distribution/prolifération au cours de l'évolution de la maladie. Les HS pourraient donc jouer un rôle important dans certains de ces aspects.



### 3.1.1.2 Les HS constituent des sites d'ancrage forts à la surface des cellules

Nous avons également développé un protocole nous permettant d'analyser par BIAcore l'adsorption de particules virales entières (virus X4 et R5 inactivés) sur une surface d'héparine. Les sensorgrammes obtenus (Figure 19) confirment tout d'abord les résultats précédents, les virus R5 n'interagissant pas de manière significative avec l'héparine (Figure 19B), alors que les virus X4 se fixent fortement sur le polysaccharide (Figure 19A). Ces résultats valident donc les travaux réalisés à partir de molécules de gp120 monomérique. Par ailleurs, l'analyse des sensorgrammes révèle que les complexes virus/HS formés sont extrêmement stables (dissociation virtuellement inexistante). Ceci s'explique probablement par la présence de multiples sites de fixation aux HS sur un virus entier. Les HS permettent donc un ancrage particulièrement efficace à la surface des cellules.



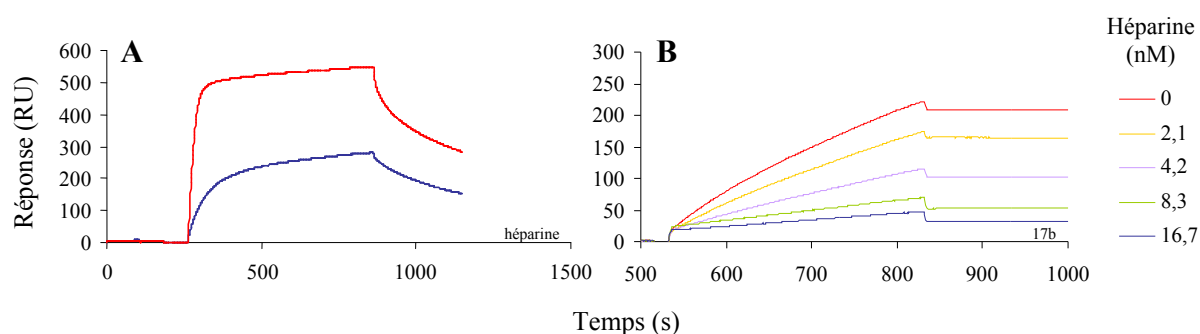
**Figure 19 : Analyse en BIAcore de l'adsorption de virus X4 et R5 sur une surface d'héparine**

Mesures d'interaction de virus de type X4 (A) ou R5 (B) sur une surface d'héparine. Les différents sensorgrammes correspondent à des injections de 6.25, 12.5, 25 et 50 µg/ml (de bas en haut) de virus, après soustraction des contrôles négatifs (lysats cellulaires non infectés).

### 3.1.1.3 CD4i, le site de fixation des corécepteurs du VIH, est également un domaine d'interaction aux HS

Enfin, les résultats sans doute les plus importants concernent l'identification d'un nouveau domaine de fixation des HS sur gp120. De nombreuses études avaient établi que la boucle V3 intervenait dans cette interaction. Nous avons également pu montrer que CD4i, le site de fixation aux corécepteurs du VIH, constituait un deuxième domaine d'interaction aux HS. Des analyses en BIAcore, réalisées sur des molécules de gp120 ou des complexes gp120/CD4

(pour lesquels l'épitope CD4i est exposé), ont démontré que ces derniers avaient une affinité bien supérieure pour le polysaccharide (Figure 20A). La participation de CD4i dans l'interaction aux HS a été confirmée en injectant ces mêmes complexes gp120/CD4, en présence ou non d'héparine, sur une surface d'anticorps 17b, un anticorps monoclonal spécifique de CD4i et pouvant donc être utilisé comme « mime » des corécepteurs. Les résultats obtenus (Figure 20B) montrent une claire inhibition par l'héparine de l'interaction CD4i/17b.



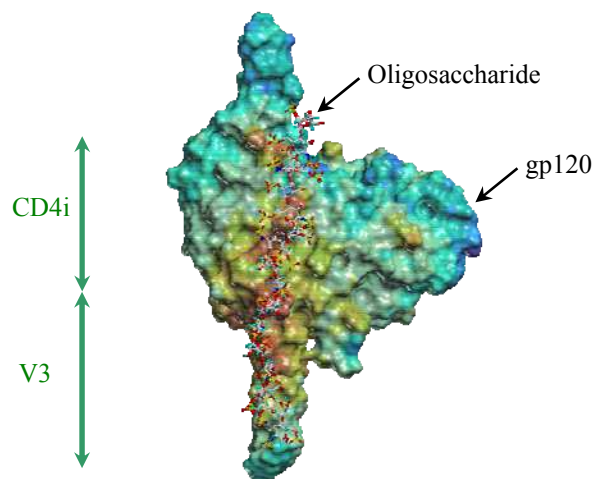
**Figure 20 : Mise en évidence de l'interaction HS/CD4i**

**A :** Interaction de gp120 (50 nM, courbe bleue) et de gp120/CD4 (50/50 nM, courbe rouge) sur une surface d'héparine.

**B :** Inhibition par l'héparine (0-16.7 nM) de l'interaction de gp120/CD4 (5 et 10 nM, respectivement) sur une surface d'anticorps 17b (anti-CD4i).

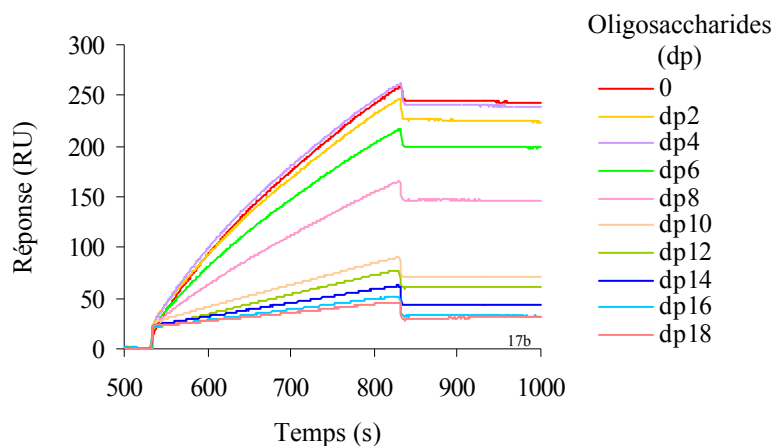
Des études du complexe gp120/héparine par modélisation moléculaire ont également montré que le polysaccharide pouvait interagir simultanément avec ses deux domaines d'interaction : la boucle V3 et l'épitope CD4i (Figure 21). Le modèle suggère de plus qu'un fragment de 10/12 monosaccharides permettrait de couvrir l'ensemble des résidus basiques de ces deux domaines.

Afin de définir plus précisément la taille oligosaccharidique nécessaire à l'interaction gp120/HS, des expériences d'inhibition de la fixation de complexes gp120/CD4 sur une surface d'anticorps 17b ont été réalisées, à l'aide d'une série d'oligosaccharides d'héparine de taille variable (du dp2 au dp18). Les résultats montrent qu'une taille d'au moins 10 monosaccharides est nécessaire pour obtenir une inhibition efficace de l'interaction (Figure 22). Les données expérimentales confirment donc les informations obtenues par modélisation moléculaire.



**Figure 21 : Etude du complexe gp120/héparine par modélisation moléculaire**

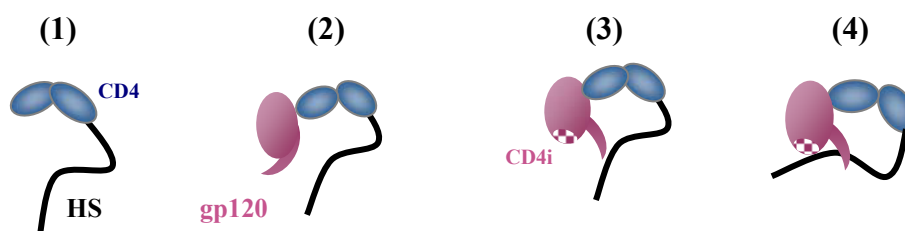
Modélisation du complexe formé par une molécule de gp120 de type X4 (HxBc2) en interaction avec un hexadécasaccharide d'héparine. La structure de gp120 a été obtenue à partir des données cristallographiques [235]. La surface MOLCAD de la glycoprotéine est colorée en fonction du potentiel électrostatique (de rouge pour basique à bleu pour acide). L'hexadécasaccharide représenté est issu d'une banque conformationnelle de fragments d'héparine et a été choisi pour s'adapter au mieux aux sites d'interaction définis par les résidus basiques de CD4i et de la boucle V3. Travail réalisé en collaboration avec le Dr A. Imberty (CERMAV-CNRS, Grenoble).



**Figure 22 : Inhibition de l'interaction de complexes gp120/CD4 sur une surface d'anticorps 17b par des oligosaccharides d'héparine**

Les complexes gp120/CD4 (5 et 10 nM, respectivement) sont pré-incubés avec des oligosaccharides de tailles différentes (du dp2 au dp18, 40 nM) avant injection sur la surface d'anticorps 17b. Les résultats montrent qu'un fragment d'héparine d'au moins dix monosaccharides de long (dp10) est nécessaire pour bloquer efficacement la fixation des complexes sur la surface.

Même si le rôle physiologique de cette interaction HS/CD4i demeurerait énigmatique, ces résultats suggéraient que des molécules dérivées d'HS pourraient être utilisées pour inhiber la fixation du VIH sur ses corécepteurs. Dans ce contexte, nous avons proposé le développement d'un composé hybride, constitué d'un fragment de CD4 soluble couplé à un oligosaccharide d'HS. Dans cette molécule, le rôle de la partie « CD4 » est d'ouvrir gp120, et ainsi d'exposer l'épitope CD4i sur lequel pourra alors se fixer l'oligosaccharide d'HS (Figure 23). Cette molécule pourrait donc permettre le blocage simultané des deux sites majeurs d'interaction de gp120 sur les cellules hôtes. Sur la base de ce concept, un brevet a été déposé en 2002 (Brevet CNRS-CEA déposé le 19/04/2002 sous le N° 02 04926). Par ailleurs, l'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication scientifique [236].



**Figure 23 : Concept de la molécule hybride CD4-HS brevetée**

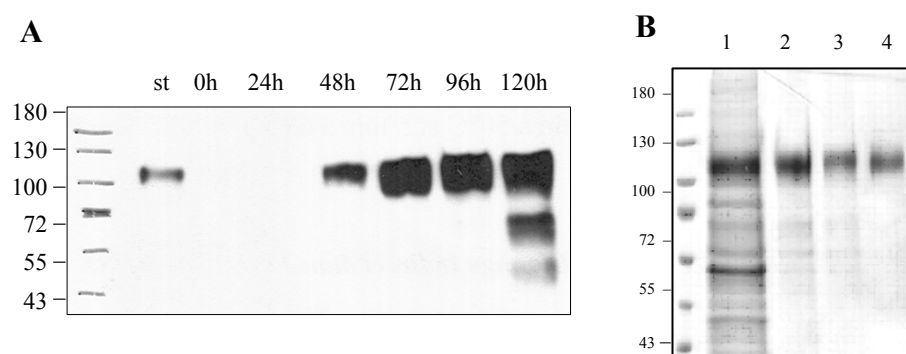
La partie « CD4 » de la molécule (1) interagit tout d'abord avec gp120 (2) et induit les changements conformationnels conduisant à l'exposition de CD4i (3). CD4i est alors accessible pour la partie « HS » de la molécule (4), qui permet donc un blocage simultané des sites de fixation du VIH sur CD4 et sur les co-récepteurs.

Pour concevoir une telle molécule, il était cependant essentiel de caractériser les deux partenaires de l'interaction, à savoir les résidus de l'épitope CD4i impliqués dans l'interaction avec les HS et la taille, ainsi que la nature, des chaînes saccharidiques les plus appropriées pour bloquer le site CD4i. Ce sont sur ces aspects que se sont concentrées mes recherches et celles d'Elodie Crublet dont j'ai co-encadré la thèse. L'objectif de nos travaux a consisté à mettre en place un système de production de gp120 au sein du laboratoire et à utiliser cette protéine recombinante afin d'identifier précisément les motifs structuraux de gp120 impliqués dans l'interaction avec les HS, au niveau de l'épitope CD4i, mais aussi ailleurs sur la protéine. Ceci a été réalisé grâce à une double approche : l'étude par mutagenèse dirigée d'acides aminés de CD4i soupçonnés d'être impliqués dans l'interaction, et la cartographie des sites de fixation aux HS ou à son analogue l'héparine (sites nommés HBDs pour « heparin binding domains »), en utilisant une méthode d'analyse développée au laboratoire (voir paragraphe 4.3).

### 3.1.2 Caractérisation des domaines d'interaction aux HS sur gp120

#### 3.1.2.1 Mise en place d'un système d'expression et de production de gp120

Afin d'étudier l'interaction gp120/HS, un système d'expression de la protéine a été développé en utilisant la technique de « Baculovirus ». Des études préliminaires ont tout d'abord été effectuées, afin de déterminer les conditions permettant une expression maximale de la protéine, notamment, l'importance de la nature de la séquence signal associée au gène de gp120, le choix de la lignée de cellules d'insecte utilisée, les conditions et temps d'infection. La Figure 24A montre les résultats observés pour l'expression de gp120 obtenue par infection de cellules d'insecte Sf21 avec un baculovirus porteur d'un bacmide codant pour la protéine gp120 associée à la séquence signal de la melittine. L'expression est suivie en fonction du temps post-infection.



**Figure 24 : Expression et purification de gp120 en cellules Sf21/Baculovirus**

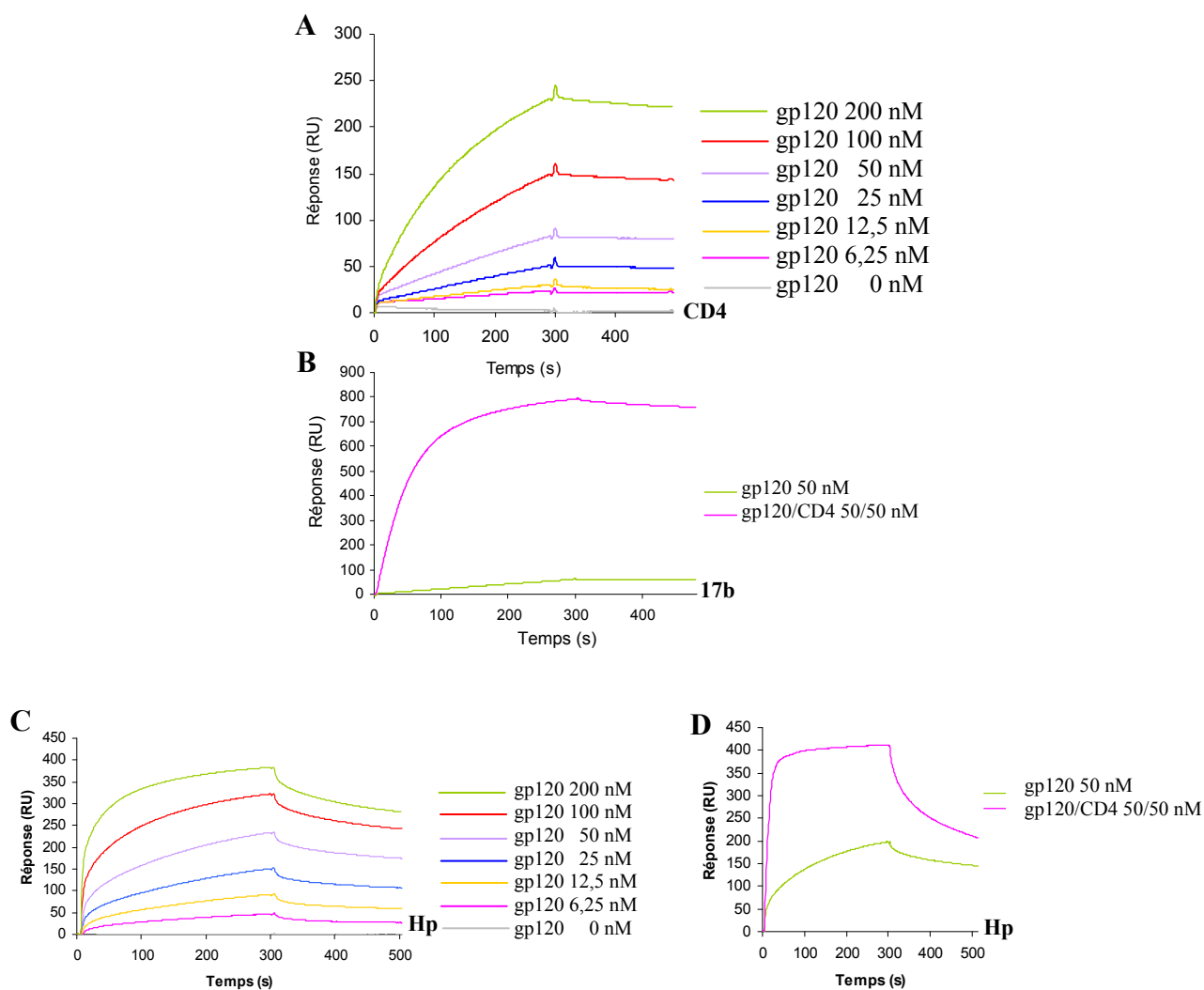
**A :** Cinétique d'expression, de gp120 dans le milieu de culture de cellules Sf21 infectées avec le baculovirus « melittine-gp120 » (Western-blot sur 40µl de milieu). Contrôle (St) : 100 ng de gp120 déposé.

**B :** Récapitulatif des étapes de purification/concentration de gp120. Analyse sur gel SDS-PAGE 10%, coloré au bleu de Coomassie après purification sur chromatographie échangeuse d'ions (1), chromatographie d'affinité (2), concentration de l'échantillon (3), puis chromatographie d'exclusion (4).

Un système de purification de la protéine a ensuite été mis au point. Celui-ci comprend 3 étapes : une purification sur colonne échangeuse de cations (SP-sépharose), une chromatographie d'affinité en utilisant une résine de lentil-lectine (fixation spécifique des protéines glycosylées) et une chromatographie d'exclusion (séparation par la taille). La Figure 24B montre un récapitulatif des différentes phase de purification. Ce protocole permet d'obtenir une protéine avec un degré de pureté d'environ 95% avec un rendement de production de 1-2 mg de protéine pure et correctement repliée, par litre de culture.

### 3.1.2.2 Propriétés fonctionnelles de la gp120 produite au laboratoire

La protéine gp120 produite a ensuite été soumise à un certain nombre de tests d'interaction, réalisés en BIAcore, afin de valider ses caractéristiques fonctionnelles (Figure 25). Les paramètres suivants ont été analysés : capacité à interagir avec CD4, 17b (l'anticorps monoclonal dirigé contre CD4i) et l'héparine.



**Figure 25 : Tests de fonctionnalité (BIAcore) de la protéine gp120 produite au laboratoire**

**A** : Analyse de l'interaction de gp120 sur une surface CD4.

**B** : Analyse de l'interaction de gp120 sur une surface 17b, en présence ou non de CD4.

**C** : Analyse de l'interaction de gp120 sur une surface héparine.

**D** : Analyse de l'interaction de gp120 sur une surface héparine, en présence ou non de CD4.

Les résultats montrent que la gp120 produite au laboratoire a la capacité de se fixer à CD4 (Figure 25A), avec une affinité estimée à 8 nM, valeur en accord avec les observations précédemment publiées. Notre protéine est reconnue par l'anticorps 17b, lorsqu'elle est en complexe avec CD4, mais pas lorsqu'elle est seule (Figure 25B). Ceci indique que l'épitope CD4i est effectivement masqué et que l'interaction avec CD4 provoque bien les changements conformationnels aboutissant à son exposition. Enfin, gp120 se fixe à l'héparine (Figure 25C) et, en accord avec nos précédentes observations, l'interaction avec CD4 augmente l'affinité de la protéine pour le polysaccharide (Figure 25D). La protéine gp120 produite au laboratoire présente donc toutes les propriétés fonctionnelles attendues.

### *3.1.2.3 Identification des HBDs de gp120*

L'identification des HBDs de gp120 a été réalisée grâce à une méthode développée au laboratoire (voir paragraphe 4.3) pour caractériser les sites d'interaction aux HS sur les protéines [237]. Cette technique, basée sur la formation de complexes covalents de la protéine d'intérêt sur des billes d'héparine, a été utilisée pour analyser de nombreuses protéines étudiées au laboratoire. L'utilisation de billes d'héparine commerciales présente cependant un double désavantage : tout d'abord, elle ne permet pas d'effectuer des analyses avec d'autres glycosaminoglycanes, ou des structures polysaccharidiques plus spécifiques que ces préparations commerciales. Ensuite, les billes peuvent être occasionnellement « lavées » au travers du séquenceur, malgré le filtre de protection utilisé, et entraîner un blocage de l'appareil. Dans ce contexte, nous avons développé une approche alternative où le support « bille » a été éliminé et l'expérience réalisée en solution (voir paragraphe 4.3). Cette technique a été utilisée pour identifier les HBDs présents sur gp120 (Figure 26).

Les résultats obtenus ont permis de détecter 3 séquences : 165-IRGKVQKEYAFFY-177 (HBD-1), où la Lys168 (et peut-être la Lys171) est engagée dans le couplage, qui appartient à la boucle V2, 292-VEINCTRPNNNTRKRIR-308 (Lys305 engagée) qui correspond à la boucle hyperbasique de V3 (le site de fixation à l'héparine caractérisé auparavant, ici appelé HBD-2) et 496-VAPTKAKRR-504, un peptide de la partie C-terminale (domaine C5, HBD-3), où la Lys499 (et peut-être la Lys501) est impliquée dans le couplage. Il est intéressant de remarquer que les 3 séquences identifiées appartiennent à des régions fonctionnellement importantes pour le virus (Figure 27). HBD-1 correspond à la partie N-terminale de la boucle

V2, un domaine qui, tout comme la boucle V3, subit des changements conformationnels importants suite à la fixation de CD4. HBD-2 appartient à la boucle V3, une structure qui joue de multiples rôles dans les propriétés biologiques de gp120, tels que la reconnaissance par des anticorps neutralisants (la boucle V3 est également appelée « déterminant principal de neutralisation »), le tropisme et la pathogénicité du virus. Enfin, la région C-terminale de gp120 dans laquelle se trouve HBD-3, est un site important car il contient une séquence de clivage par la furine permettant la coupure de la protéine env (gp160) en vue d'obtenir les protéines fonctionnelles gp120 et gp41. Des études ont par ailleurs montré que l'héparine augmentait la capacité de la furine à couper des peptides correspondant à la région C-terminale de gp120 [238]. HBD-3 pourrait donc jouer un rôle dans ce processus.

**A**

*MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEV*  
*HNWATHACVPTDPNPQEVVLNVNVTENFNMWKNDMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLK*  
*CTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDNDTTSYKLTS*  
*CNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFNGTGPCNTVSTVQCTHGIRPVVSTQLL*  
*LNGSLAEEEVVIRSVNFTDNAKTIIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGN*  
*MRQAHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQL*  
*FNSTWFNSTWSTEGSNNTSGSDTITLPCRIKQIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLT*  
*RDGGNSNNESEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRRVVQREKR*

**B**

(i)

*IRGKVQKEYAFFYKLDI*  
*VEINCTRPNNNTRKRIRIQ*  
*VAPTAKRRV*

(ii)

*IRGKVQKEYAFFY*  
*VEINCTRPNNNTRKRIR*  
*VAPTAKRR*

*MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEV*  
*HNWATHACVPTDPNPQEVVLNVNVTENFNMWKNDMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLK*  
*CTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDNDTTSYKLTS*  
*CNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFNGTGPCNTVSTVQCTHGIRPVVSTQLL*  
*LNGSLAEEEVVIRSVNFTDNAKTIIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGN*  
*MRQAHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQL*  
*FNSTWFNSTWSTEGSNNTSGSDTITLPCRIKQIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLT*  
*RDGGNSNNESEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRRVVQREKR*

**Figure 26 : Identification des domaines d'interaction aux HS de gp120**

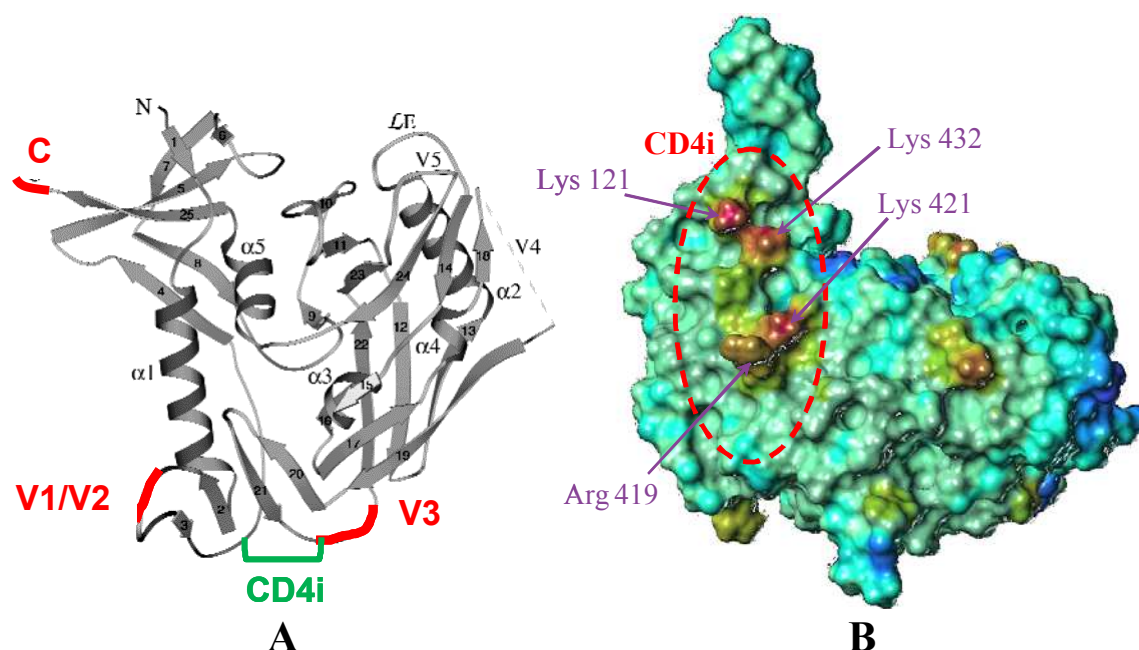
**A** : Séquence protéique de gp120. Les lysines et les arginines sont représentées en gras et le peptide signal est noté en italique.

**B** : Analyse des peptides se liant à l'héparine. (i) et (ii) sont le résultat des deux expériences indépendantes. Les acides aminés impliqués dans le couplage avec l'héparine sont représentés en rouge et les résidus partagés par plusieurs séquences sont notés en rose. Les résultats obtenus sont reportés sur la séquence complète de gp120 (en gris).



### 3.1.2.4 Etude du site CD4i de gp120 par mutagenèse dirigée

Nos travaux précédents ont montré par ailleurs que les HS pouvaient également interagir avec gp120 au niveau de l'épitope CD4i, le site de fixation aux corécepteurs. Etant donné l'importance stratégique de cet épitope et les applications thérapeutiques potentielles pouvant découler de cette observation, il était essentiel de caractériser les déterminants structuraux impliqués dans cette interaction, et notamment les résidus de l'épitope CD4i participant à la reconnaissance du polysaccharide. Pour cela, des expériences de mutagenèse dirigée sur les quatre résidus ciblés au niveau du site CD4i ont été réalisées. Le choix des résidus étudiés s'est effectué à partir des données obtenues par modélisation moléculaire (Figure 27).



**Figure 27 : Domaines d'interaction aux HS sur gp120**

Molécule de gp120 de type X4 (HXBc2) modélisée à partir des données cristallographiques [235].

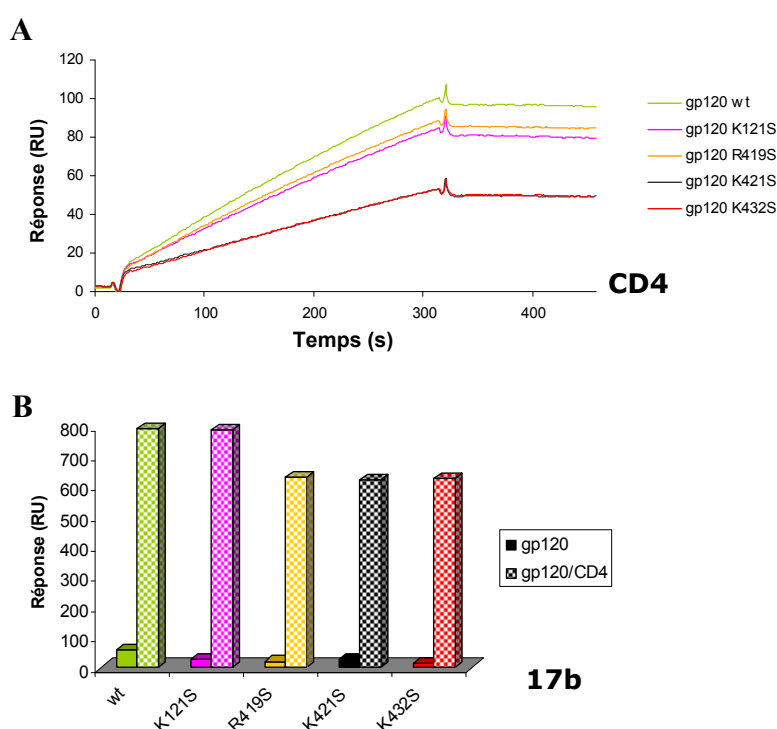
**A** : Localisation sur gp120 des 3 HBDs identifiés par l'approche « billes », et de CD4i.

**B** : Positionnement sur gp120 de CD4i et des 4 acides aminés étudiés par mutagenèse dirigée (surface MOLCAD colorée en fonction du potentiel électrostatique, de rouge pour basique à bleu pour acide).

Ainsi, les acides aminés Lys121, Arg419, Lys421 et Lys432 ont été remplacés par des sérines pour obtenir les protéines portant des mutations simples gp120-K121S, gp120-R419S, gp120-K421S et gp120-K432S. Ces protéines mutées ont été ensuite exprimées puis purifiées selon le protocole décrit au paragraphe 3.1.2.1.

### Tests de fonctionnalité des différents mutants de gp120

L'activité de ces différents mutants de gp120 a tout d'abord été testée. Dans un premier temps, il était important de vérifier que les mutations réalisées sur la protéine gp120 n'altèrent pas sa capacité à interagir avec CD4. De même, il était nécessaire d'étudier le comportement des protéines mutées, en complexe avec CD4, sur la surface 17b, afin de vérifier que l'épitope CD4i est toujours fonctionnel. En effet, parmi les quatre acides aminés du site CD4i mutés, trois (K121, R419 et K421) sont directement engagés dans l'interaction avec 17b.



**Figure 28 : Tests de fonctionnalité des différents mutants de gp120**

**A :** Analyse en BIAcore de l'interaction de gp120 (sauvage ou mutantes) avec CD4.

**B :** Analyse en BIAcore de l'interaction de gp120 (sauvage ou mutantes) avec 17b, en présence ou non de CD4.

Nos résultats montrent que toutes les protéines interagissent avec CD4, même si les protéines mutées fixent CD4 de façon légèrement moins forte (Figure 28A). Les protéines sauvages ou mutées sont ensuite injectées sur la surface 17b, seules ou préincubées avec CD4, afin de valider l'exposition du site CD4i par CD4 (Figure 28B). Les résultats obtenus montrent que la protéine gp120 se fixe faiblement lorsqu'elle est injectée seule sur la surface 17b, qu'il s'agisse de la forme sauvage ou des mutants. La préincubation avec CD4 entraîne en revanche

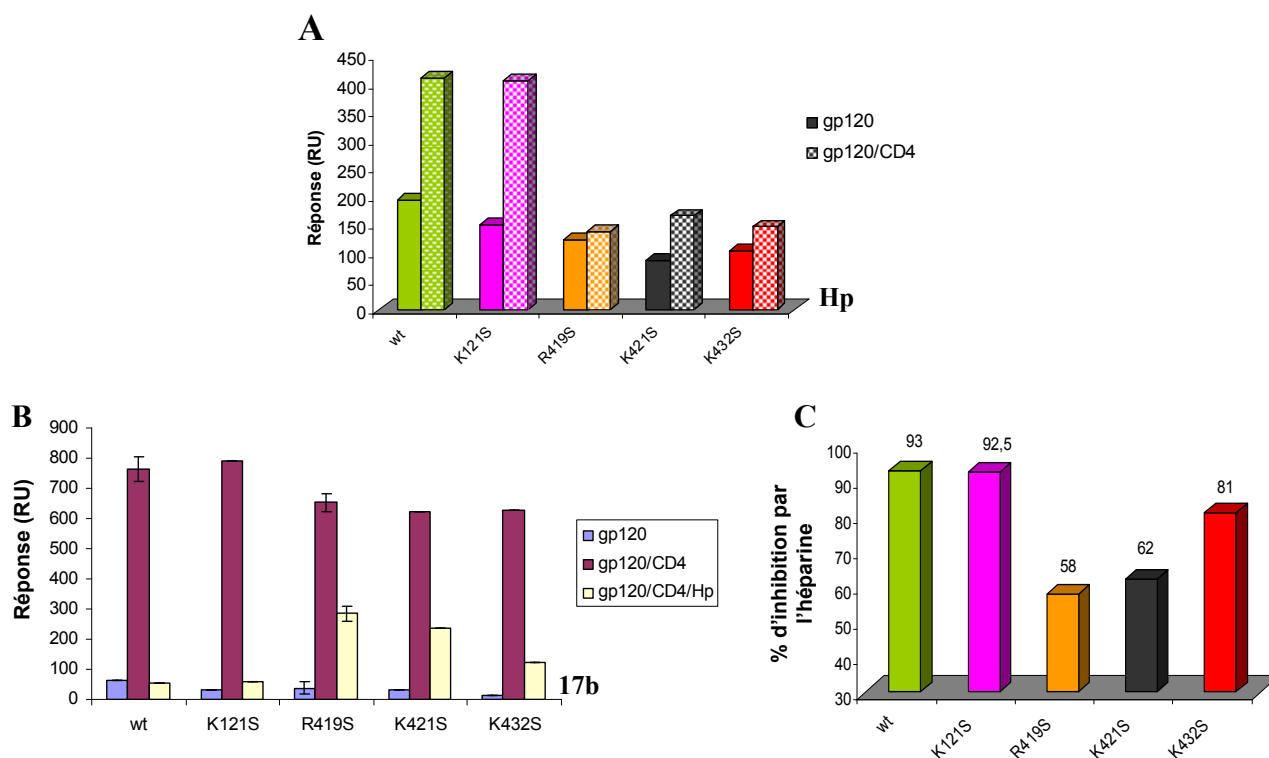
une augmentation significative de la fixation de gp120 à l'anticorps 17b, pour toutes les protéines. La protéine sauvage et le mutant gp120-K121S présentent des réponses identiques et les trois autres mutants des signaux relativement proches. Ces observations permettent de conclure que le site CD4i n'est pas exposé dans la conformation native de la protéine (faible fixation de gp120 seule) et donc, que les mutations réalisées n'altèrent pas la conformation de la protéine. De plus, CD4 est capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i et celui-ci, muté sur l'un des quatre acides aminés étudiés, garde sa capacité à interagir avec 17b.

Ces deux expériences permettent de conclure que les protéines produites (sauvage et mutantes) sont fonctionnelles : elles interagissent avec CD4 et cette interaction expose l'épitope CD4i. Les mutants R419S, K421S et K432S présentent une fixation sur 17b, en présence de CD4, plus faible que la protéine sauvage. Cela peut s'expliquer par le fait qu'ils se fixent légèrement moins à CD4, comme le montre la Figure 28A, et non par le fait que l'épitope CD4i est déstructuré.

#### Interaction des mutants de gp120 avec l'héparine

Après avoir validé la fonctionnalité des protéines mutantes, nous avons analysé leur interaction avec l'héparine afin de déterminer l'implication relative de chacun des quatre résidus étudiés. Deux types d'expériences en BIAcore ont été réalisées dans le but d'étudier l'interaction gp120/héparine. Tout d'abord, l'engagement des acides aminés du site CD4i dans la fixation de l'héparine a été étudié de façon directe, par mesure d'interaction des mutants sur la surface d'héparine. Dans ce but, gp120, seule ou préincubée avec CD4, a été injectée sur une surface d'héparine.

Les résultats de ces analyses d'interaction « directe » montrent que le mutant gp120-K121S présente une réponse identique à celle de la protéine sauvage (Figure 29A). La lysine 121 ne semble donc pas impliquée dans la fixation à l'héparine. En revanche, la présence de CD4 n'augmente pas la liaison à l'héparine des mutants gp120-R419S, gp120-K421S et gp120-K432S. Ces résultats permettent donc de conclure que ces résidus sont effectivement engagés dans la liaison à l'héparine. En particulier, l'arginine 419 semble essentielle à l'interaction CD4i/héparine, puisqu'en présence de CD4, la fixation de gp120 à l'héparine n'augmente quasiment pas (124 RU sans CD4 et 139 RU avec CD4).



**Figure 29 : Interaction des mutants de gp120 avec l'héparine**

**A** : Analyse « directe », par mesure de l'interaction en BIAcore de gp120 (sauvage ou mutantes) avec l'héparine, en présence ou non de CD4.

**B** : Analyse « indirecte », par mesure de la capacité de l'héparine à inhiber l'interaction de gp120 (sauvage ou mutantes) avec 17b, en présence ou non de CD4.

**C** : Expression des résultats de (B) sous la forme de pourcentage d'inhibition de l'interaction gp120/17b par l'héparine.

Nous avons ensuite utilisé une approche « indirecte », où les résidus de CD4i impliqués dans l'interaction avec le polysaccharide ont été identifiés en analysant le pouvoir compétiteur de l'héparine sur l'interaction gp120/17b, en présence de CD4. Dans ce cas, gp120 a été injectée sur une surface 17b, seule, préincubée avec CD4, ou avec CD4 et de l'héparine. L'injection sur la surface 17b de gp120 préalablement incubée avec CD4 et avec l'héparine, permet de déterminer le pourcentage d'inhibition par l'héparine de l'interaction CD4i/17b (wt, Figure 29B et C). Plus l'affinité de l'héparine pour CD4i est forte, plus le pourcentage d'inhibition est élevé. Ainsi, les résultats montrent que l'héparine inhibe l'interaction de 17b avec gp120 sauvage et gp120-K121S respectivement à 93 et 92,5% (Figure 29C), confirmant que l'absence de K121 n'empêche pas l'héparine de fixer l'épitope CD4i. En revanche, l'inhibition de l'interaction CD4i/17b par l'héparine diminue fortement pour les mutants gp120-R419S (58%) et gp120-K421S (62%), indiquant que ces acides aminés interagissent

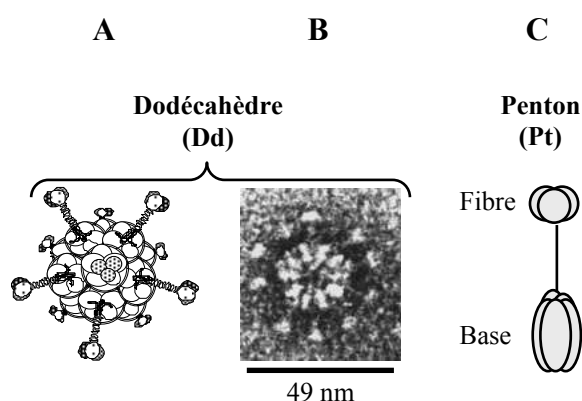
probablement avec l'héparine. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par analyse « directe » de la fixation de gp120 sur la surface héparine. Le mutant gp120-K432S semble également interagir avec l'héparine, mais avec une plus faible affinité (81% d'inhibition).

### **3.1.3 Conclusion et perspectives**

Ce projet, pour lequel j'ai été initialement recruté au CNRS en 2002 a poursuivi sa maturation, sous l'impulsion de mes travaux et de ceux d'Elodie Crublet, dont j'ai co-dirigé la thèse (soutenance orale le 8/02/2008). En un peu plus de 5 ans, nos travaux ont démontré les implications multiples des HS dans ces mécanismes. Les résultats décrits dans ce rapport mettent à jour une cartographie complète des régions d'interaction entre gp120 et ces polysaccharides, avec entre autres, la caractérisation de 4 HBDs situés à des positions stratégiques pour les propriétés biologiques de la protéine. Dans le cadre du développement de la molécule hybride CD4-HS, d'autres aspects non détaillés dans ce manuscrit ont été également explorés, notamment l'expression de CD4 sous forme recombinante, la production de banques de dodécasaccharides et les conditions de couplage chimique protéine/GAGs. Notre étude de l'interaction HS/gp120 a fait l'objet de deux publications scientifiques [236, 239] et l'ensemble de ces travaux a fourni une base d'information structurale ayant conduit depuis à la conception de l'inhibiteur CD4-HS du VIH [240].

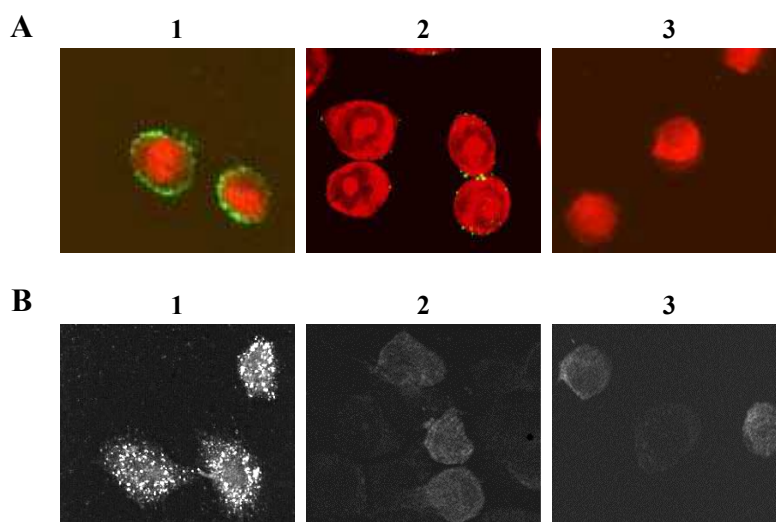
### **3.2 ROLES DES HS DANS LA FIXATION ET L'ENTREE DES DODECAEDRES DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 3**

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Pascal Fender (UVHCI, Grenoble, France), j'ai réalisé l'étude de l'interaction des HS avec les protéines de capsid de l'Adénovirus de type 3 (Ad3). Au cours du cycle infectieux de l'Ad3, le penton, un des constituants de la capsid du virus, est produit en excès et peut s'auto-assembler pour former une structure complexe de symétrie dodécaédrique (Figure 30). Ces particules (Dds), dont le rôle physiologique reste mal connu, peuvent entrer dans les cellules avec une grande efficacité. Des travaux ont ainsi montré que les Dds pouvaient constituer des outils biotechnologiques intéressants pour le transfert de protéines ou de gènes à l'intérieur des cellules [241-242].



**Figure 30 : Le Dodécaèdre de l'Ad3**

Représentation schématique (A) et image en microscopie électronique (B) du dodécaèdre (Dd) de l'Ad3, formé par l'assemblage de 12 pentons (Pt). Le Pt est un des constituants de la capside de l'Ad3, formé par l'association non covalente de 2 trimères de protéines : la fibre et la base (C).



**Figure 31 : Les HS permettent l'attachement et l'entrée des Dds dans des cellules non permissives pour l'Ad3**

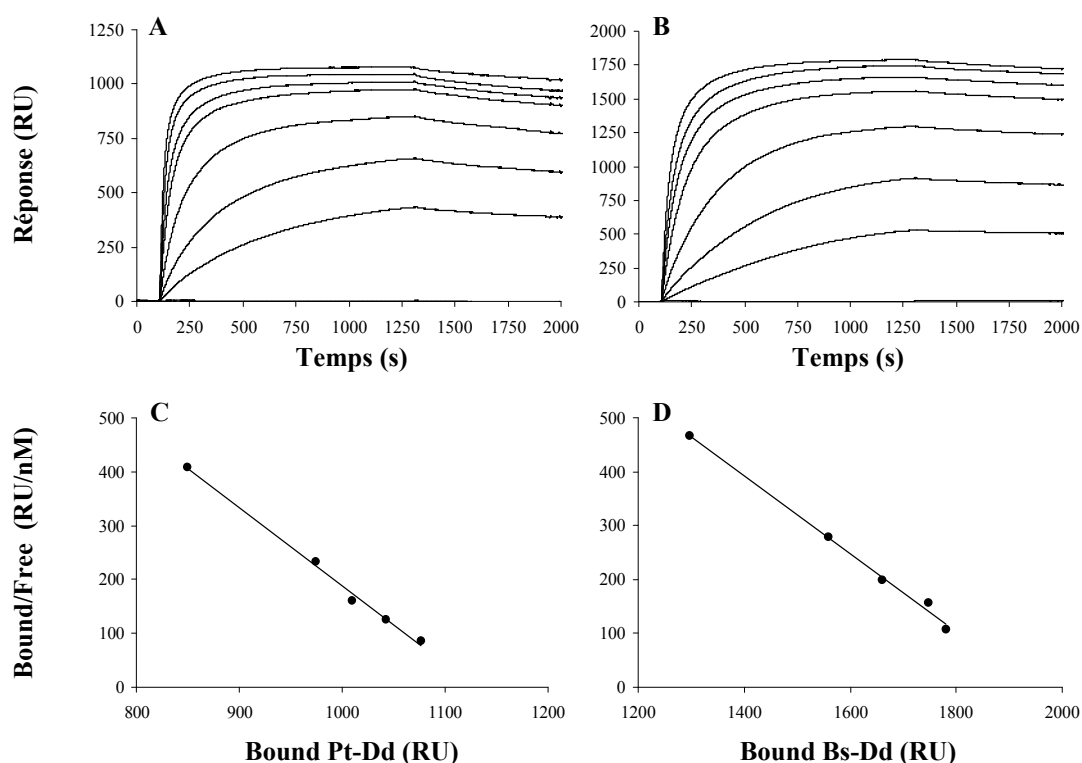
**A** : Analyse par microscopie confocale de l'attachement de Dds marqués au FITC (fluorescein isothiocyanate, signal vert) à la surface de cellules CHO-K1 non permissives pour l'Ad3, dont les noyaux sont marqués à l'IP (Iodure de propidium, signal rouge). L'incubation Dd-cellules est réalisée à 4°C en présence d'azide de sodium, afin de bloquer les processus d'internalisation (A1). La fixation des Dds est fortement inhibée par l'addition d'héparine (0.01 µg/ml, A2). Par ailleurs, les Dds ne peuvent se fixer sur les CHO-2241, une lignée cellulaire mutante, déficiente pour la synthèse d'HS (A3).

**B** : Internalisation des Dds marqués au FITC dans les cellules CHO-K1. L'accumulation de Dds dans le cytoplasme péri-nucléaire est clairement indiquée par le signal fluorescent ponctué (B1). L'entrée des Dds est complètement inhibée par l'addition d'héparine (B2), ou le traitement des cellules au chlorate qui bloque la sulfatation des HS endogènes (B3).

Nous avons remarqué que les Dds pouvaient entrer dans des cellules qui ne sont pas permissives à l'Ad3, ce qui suggérerait l'existence d'un mode d'attachement et/ou

d'internalisation distinct de celui du virus. Par des techniques de FACS et de microscopie confocale, nous avons tout d'abord pu montrer que la fixation des Dds sur ces cellules s'effectuait par les HS (Figure 31A1).

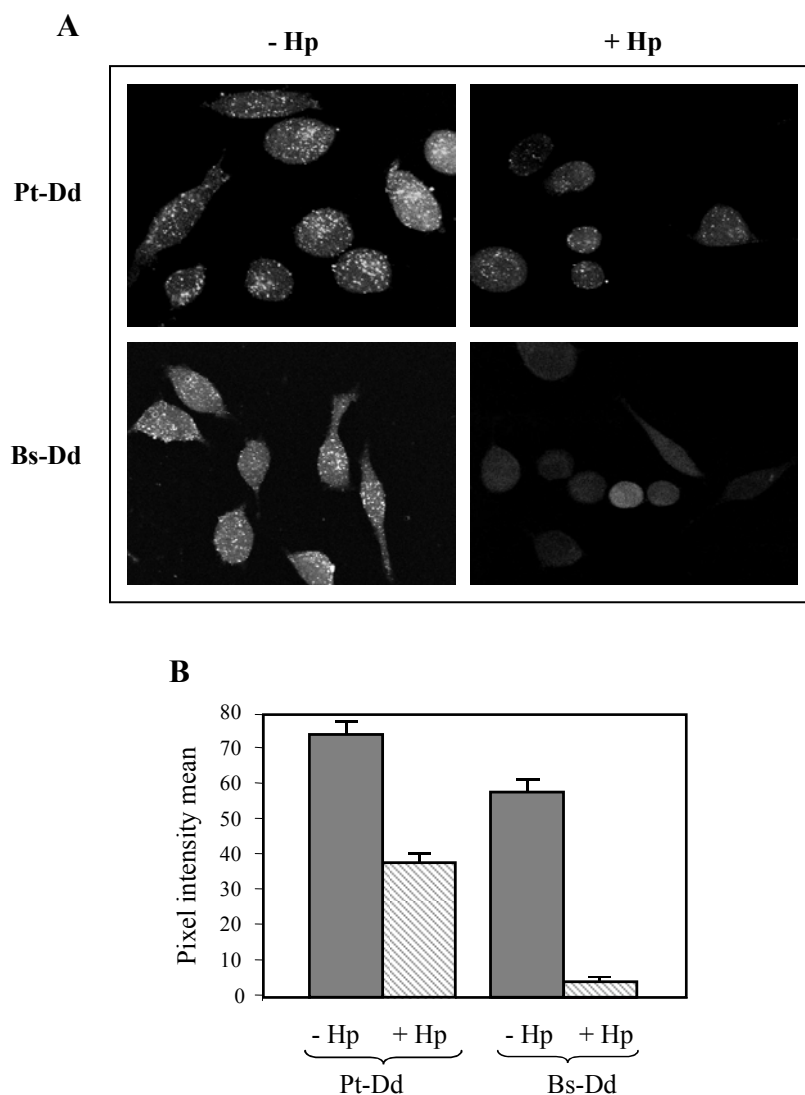
Ainsi, l'attachement des Dds sur des cellules CHO-K1 (non permissives pour l'Ad3) peut être bloqué de manière très efficace par l'héparine (Figure 31A2). Le rôle des HS dans l'interaction est de plus confirmé par l'incapacité des Dds à se fixer sur les cellules mutantes CHO-2241 qui ne possèdent pas d'HS à leur surface (Figure 31A3). Des analyses en BIAcore réalisés sur des dodécaèdres-fibre (Pt-Dd, formés de 12 pentons entiers) et dodécaèdres-base (Bs-Dd, pour lequel la protéine fibre est absente) ont révélé que cette interaction était de forte affinité et s'effectuait par l'intermédiaire de la base du penton (Figure 32). Outre un rôle dans l'attachement, nous avons enfin établi que l'interaction avec les HS constituait la première étape d'un nouveau mode d'internalisation des Dds dans les cellules, indépendant du processus d'entrée conventionnel de l'Ad3 pour lequel la protéine fibre est nécessaire (Figure 33).



**Figure 32 : Analyse de l'interaction Dd/héparine en BIAcore**

Les dodécaèdres-fibre (Pt-Dd) et -base (Bs-Dd) ont été injectés à 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 et 60  $\mu\text{g/ml}$  sur une surface d'héparine. Sensorgrammes obtenus et analyse de Scatchard des données à l'équilibre pour Pt-Dd (A et C) et Bs-Dd (B et D).

Ces résultats apportent donc des informations nouvelles pour l'étude du rôle physiologique des Dds, ainsi que pour le développement d'applications à visée thérapeutique. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication [243].



**Figure 33 : Rôle des HS dans l'entrée des Dds dans des cellules permissives pour l'Ad3**

Internalisation des Pt-Dd et Bs-Dd marqués au FITC dans les cellules HeLa permissives à l'Ad3, préincubés ou non avec 10 µg/ml d'héparine.

**A** : Observation au microscope confocal.

**B** : Quantification par mesure de l'intensité de fluorescence.

La poursuite de ces travaux a récemment permis de mettre en évidence une action concertée des PGs et des intégrines dans le mécanisme d'entrée des Dds [244-245]. Ces résultats contribuent non seulement à une meilleure compréhension du mode d'action de ces particules



pseudo-virales, mais présentent également un intérêt en biotechnologie et vectorologie, dans le cadre d'une utilisation des Dds pour le transfert de protéines ou d'ADN [241-242].

### **3.3 *ROLE DES GAGS DANS LES PROCESSUS INFLAMMATOIRES : INTERACTION RANTES/HS***

Les chimiokines forment une famille d'une cinquantaine de petites protéines (entre 7 et 12 kDa). Elles se caractérisent principalement par leur propriétés chimioattractantes et leur rôle dans la migration des cellules immunitaires, mais sont également impliquées dans d'autres fonctions physiologiques et pathologiques, telles que le développement, l'angiogénèse, la réparation tissulaire et le Cancer [246]. Les chimiokines se subdivisent en 4 sous-familles, en fonction de la position relative de deux cystéines conservées dans la région N-terminale de la protéine, définissant ainsi, les CC, CXC, CX3C et C chimiokines [247]. L'activité des chimiokines s'exerce *via* leur interaction avec des membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). Ces interactions définissent un réseau très complexe de systèmes ligand-récepteur, où une même chimiokine peut reconnaître différents récepteurs et un récepteur donné peut accepter pour ligand plusieurs chimiokines, permettant ainsi une régulation extrêmement fine des activités de ces protéines. Enfin, les chimiokines fixent les GAGs, cette interaction jouant des rôles multiples sur leur activité. Tout d'abord, elle permet la formation et la stabilisation des gradients chimiotactiques impliqués dans le contrôle de la migration des cellules de l'immunité (voir paragraphe 1.4.1.4). La fixation des chimiokines aux HS joue également un rôle de protection en prévenant leur inactivation par protéolyse, comme il l'a été montré dans le cas de la dégradation de la chimiokine SDF1 $\alpha$  par la protéase CD26 [248]. Les HS favorisent de plus la dimérisation, oligomérisation ou hétérodimérisation des chimiokines, phénomène qui pourrait influencer les propriétés biologiques de ces protéines, en favorisant par exemple l'homo- ou l'hétérodimérisation des GPCRs [249-250]. Enfin, la formation de complexes avec les HS pourrait moduler l'activité des chimiokines en altérant sélectivement leur capacité de reconnaissance par certains récepteurs. Il a par exemple été montré que la mutation du domaine de fixation aux HS de la chimiokine RANTES conduisait à une forte réduction de l'interaction avec le récepteur CCR1, mais n'avait aucun impact pour la fixation au récepteur CCR5 [251-252].

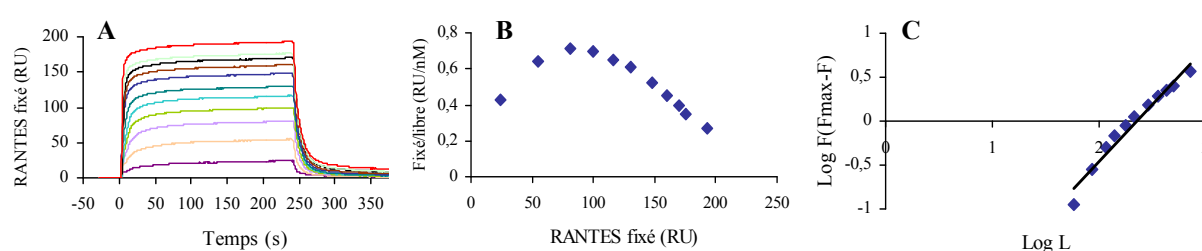
Dans le cadre de mes travaux, je me suis tout particulièrement intéressé à cette dernière chimiokine RANTES (ou CCL5). En effet, outre ses propriétés pro-inflammatoires et son rôle dans de nombreuses pathologies (maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde, sclérose en plaque, cancer...), de par sa capacité à se fixer au récepteur CCR5, RANTES présente une activité anti-VIH [253].

RANTES est une CC-chimiokine de 7.2 kDa, exerçant ses activités pro-inflammatoires *via* son interaction aux récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5. L'étude de cette chimiokine prend un nouveau tournant quand en 1995, Cocchi *et al.* mettent en évidence ses propriétés anti-VIH [254], propriétés très rapidement associées à sa capacité de fixation à CCR5, le corécepteur des isolats R5 du virus (voir paragraphe 3.1) [255]. Cependant, l'utilisation d'un puissant médiateur pro-inflammatoire tel que RANTES à des fins thérapeutiques étant inenvisageable, des études ont conduit au développement d'antagonistes de la chimiokine et notamment d'une forme de RANTES tronquée de ses 8 premiers acides aminés, RANTES(9-68), retenant sa capacité de fixation aux récepteurs et donc son activité anti-VIH, mais incapable d'induire une réponse cellulaire [253].

Comme toute chimiokine, RANTES se fixe également aux HS, l'importance de cette interaction pour l'activité ayant été démontrée *in vivo* [157]. Le rôle de cette interaction a également été étudié au regard des propriétés anti-VIH de la chimiokine, mais a conduit à des résultats contradictoires. Ainsi, si les HS de surface cellulaire potentialisent l'activité anti-VIH de RANTES (probablement en facilitant sa rétention à la surface cellulaire) [256-257], l'ajout d'HS solubles, qui devraient entrer en compétition avec ceux présents sur les cellules, augmente l'activité antivirale de la chimiokine dans certains systèmes cellulaires [258], mais pas dans d'autres [257]. Dans ce contexte, il convenait de clarifier les mécanismes impliqués dans l'interaction RANTES/HS. La chimiokine ayant une forte tendance à l'auto-oligomérisation, nous avons décidé de mener cette étude sur RANTES(9-68) qui demeure sous forme monomérique en solution [259], afin de pouvoir analyser la contribution directe du polysaccharide dans les phénomènes de dimérisation.

Nous avons tout d'abord analysé la dynamique de l'interaction RANTES(9-68)/héparine en BIAcore. L'analyse des sensorgrammes obtenus (Figure 34A) a révélé que la fixation de RANTES sur l'héparine présentait des cinétiques complexes. Cette observation a été confirmée par l'étude des données obtenues à l'équilibre suivant les représentations de

Scatchard (Figure 34B) et de Hill (Figure 34C), indiquant une interaction gouvernée par un processus de coopérativité positive. Nous avons établi un modèle mathématique décrivant les données expérimentales obtenues, qui nous a permis de déterminer les valeurs d'affinité de RANTES pour l'héparine : 398 nM pour la première interaction, et seulement 84 nM pour la deuxième interaction bénéficiant de l'effet de coopérativité positive. Ce phénomène s'explique probablement par la capacité d'une deuxième molécule de RANTES se fixant sur une chaîne d'héparine à établir des interactions à la fois avec le polysaccharide et avec une première molécule de RANTES précédemment fixée.



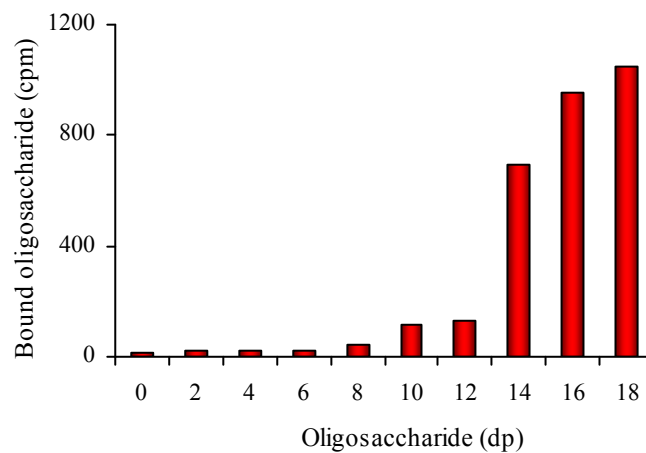
**Figure 34 : Analyse de l'interaction RANTES(9-68)/héparine en BIAcore**

**A :** Sensorgrammes obtenus par injection d'une série de concentrations de RANTES (0.4-3  $\mu\text{g/ml}$ ) sur une surface d'héparine.

**B :** Analyse de Scatchard des données à l'équilibre, la courbe en cloche obtenue est caractéristique des phénomènes de coopérativité positive.

**C :** Analyse de Hill. Cette représentation permet de déterminer un coefficient de coopérativité  $n=1.66$ . Une telle valeur suggère un processus de dimérisation coopérative.

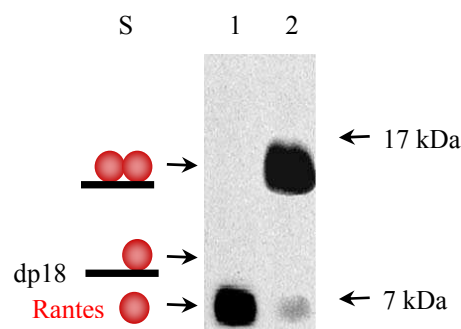
En parallèle, nous avons cherché à déterminer la taille oligosaccharidique optimale permettant de promouvoir une interaction avec la chimiokine, soit par des expériences de compétition en BIAcore (pré-incubation de RANTES(9-68) avec des oligosaccharides de taille définie avant injection sur une surface d'héparine), soit par la méthode de Dot-Blot sur membrane de nitrocellulose. Pour cette dernière approche, RANTES(9-68) a été pré-incubé avec des oligosaccharides radiomarqués (obtenus par marquage métabolique au tritium d'HS de CHO), puis passé au travers d'une membrane de nitrocellulose, les HS retenus sur la membrane (et donc associés à la protéine) étant ensuite élués par un tampon salin (PBS, 2M NaCl) puis quantifiés par mesure de la scintillation. Les résultats (Figure 35) montrent qu'une fixation significative avec RANTES(9-68) n'est obtenue que pour des oligosaccharides relativement longs (au moins 14 unités saccharidiques), un dp18 correspondant probablement à la taille optimale pour l'interaction.



**Figure 35 : Interaction RANTES(9-68)/HS : influence de la taille du motif oligosaccharidique**

Analyse par « filter binding assay » de l'interaction de RANTES(9-68) avec des oligosaccharides d'HS de taille définie, préparés par marquage métabolique ( $[^3\text{H}]$ -glucosamine) et digestion à l'héparinase III de chaînes d'HS de cellules CHO.

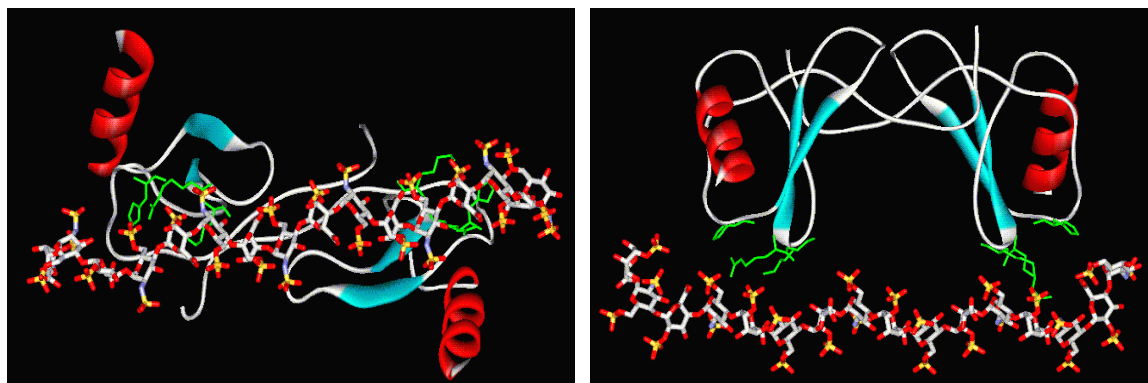
Nous avons ensuite produit des complexes covalents de RANTES(9-68) sur des octadécasaccharides d'héparine, en utilisant un protocole de couplage à l'EDC/NHS adapté à l'étude des interactions protéine/GAG [260-261]. L'analyse de ces complexes par Western blotting a ainsi révélé la formation exclusive de complexes RANTES/oligosaccharides avec une stœchiométrie de (2 :1), renforçant ainsi l'hypothèse d'une dimérisation de la chimiokine induite par le polysaccharide (Figure 36).



**Figure 36 : Stœchiométrie d'un complexe RANTES(9-68)/oligosaccharide stabilisé par couplage covalent**

Analyse par Western-blotting de RANTES(9-68) seul (1), ou après incubation avec un octadécasaccharide (dp18) d'héparine activé à l'EDC/NHS (2). S : Représentation schématique et distances de migration des complexes attendus, en fonction de leur stœchiométrie.

A partir de ces données et en tenant compte du domaine d'interaction aux HS identifié sur RANTES par mutagenèse dirigée [157, 252], nous avons réalisé la modélisation d'un complexe entre RANTES et un hexadécasaccharide d'héparine (Figure 37).



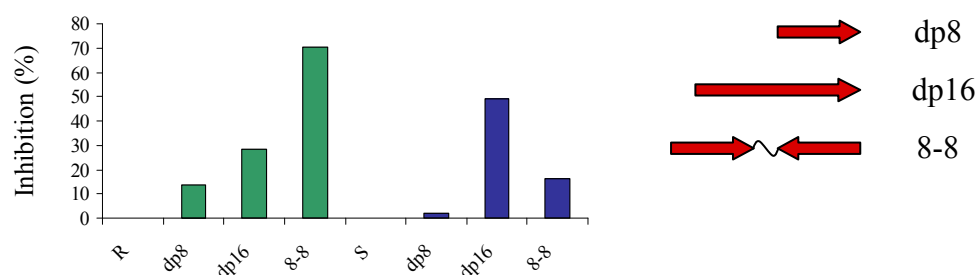
**Figure 37 : Modélisation de l'interaction entre un dimère de RANTES et un hexadécasaccharide d'héparine**

Modélisation du complexe formé par RANTES en interaction avec un hexadécasaccharide d'héparine (programme GRID), en utilisant les données structurales publiées pour l'héparine [262] et pour RANTES [263]. Travail réalisé en collaboration avec le Dr A. Imberty (CERMAV-CNRS, Grenoble).

Celui-ci, en nous permettant de visualiser les points de contact entre la protéine et le sucre, a constitué une source d'information précieuse pour la suite de nos travaux. Nous avons en effet pu prédire, à partir de ce modèle, qu'une structure oligosaccharidique capable de fixer RANTES correspondait à un fragment relativement long composé de deux domaines d'interaction à ses extrémités, et d'une région centrale "passive", où les groupements sulfate ne prendraient probablement pas part à la formation du complexe. Grâce à ces données, nous avons entrepris la construction « d'analogues structuraux », par couplage de deux octasaccharides « tête-bêche », séparés par un bras espaceur non chargé (composé 8-8, voir Figure 38).

Les tests réalisés en BIAcore ont montré que 8-8 inhibait beaucoup plus efficacement l'interaction RANTES(9-68)/héparine que les octasaccharides sous forme monomérique (dp8) ou qu'un oligosaccharide naturel de taille équivalente (un hexadécasaccharide ou dp16). Ces résultats s'expliquent par le fait que le composé 8-8 présente le double avantage d'une flexibilité accrue au niveau de sa région centrale, permettant d'optimiser l'orientation des oligosaccharides couplés au niveau des zones de contact, et d'une orientation anti-parallèle

des domaines d'interaction qui reproduit sur le sucre la symétrie observée pour le dimère de RANTES. En revanche, 8-8 s'est révélé être un faible inhibiteur de l'interaction SDF1 $\alpha$ /héparine. Cette chimiokine se fixe également à l'héparine sous forme d'un dimère, mais dans ce cas les domaines d'interaction au polysaccharide sont contigus [248], la structure de 8-8 s'avère donc inadaptée.



**Figure 38 : Inhibition de la fixation de RANTES(9-68) et SDF-1 $\alpha$  sur une surface d'héparine par les oligosaccharides couplés « tête-bêche »**

Mesures d'inhibition effectuées par injection de RANTES (vert) ou SDF-1 $\alpha$  (bleu), seuls (R et S, respectivement) ou pré-incubés avec une préparation d'octasaccharides (dp8), d'hexadecasaccharides (dp16) ou d'octasaccharides couplés « tête-bêche » (8-8). La partie droite de la figure est une représentation schématique des différents fragments testés, où la tête de la flèche correspond à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide.

L'ensemble des travaux réalisés sur la chimiokine RANTES nous ont donc permis de mettre en évidence un mode d'interaction inédit dans le contexte d'un système protéine-sucre, conduisant à une dimérisation de la chimiokine induite par le polysaccharide *via* un phénomène de coopérativité positive. Ils ont également fourni des données structurales importantes sur le complexe RANTES/HS, validées à la fois par des approches expérimentales et de modélisation moléculaire. Enfin, ces travaux constituent un exemple intéressant d'utilisation de ces données structurales pour le développement d'analogues structuraux spécifiques d'un ligand donné. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Biochemistry* [264].

## 4 UNE NECESSITE PERMANENTE : LES DEVELOPPEMENTS

### METHODOLOGIQUES

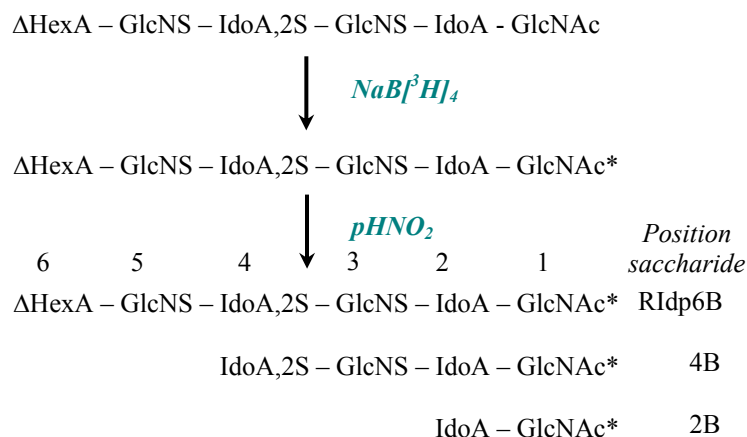
Malgré l'intérêt considérable que les GAGs représentent pour la compréhension de processus physiologiques et pathologiques aussi nombreux que variés, leurs mécanismes d'action, ainsi que les motifs oligosaccharidiques associés à leurs fonctions demeurent encore mal connus. L'analyse des interactions protéines-GAGs est un champ disciplinaire relativement récent, rendu particulièrement difficile, de par la complexité structurale inhérente à ces molécules, et le manque d'outils méthodologiques disponibles pour leur étude. Ainsi, tout au long de mes travaux de recherche, je me suis investi dans le développement de nouvelles techniques pouvant faciliter l'analyse de la structure des HS et de leurs propriétés biologiques.

#### 4.1 SÉQUENÇAGE D'OLIGOSACCHARIDES : LE « TRITIUM END LABELLING SEQUENCING » (TELS)

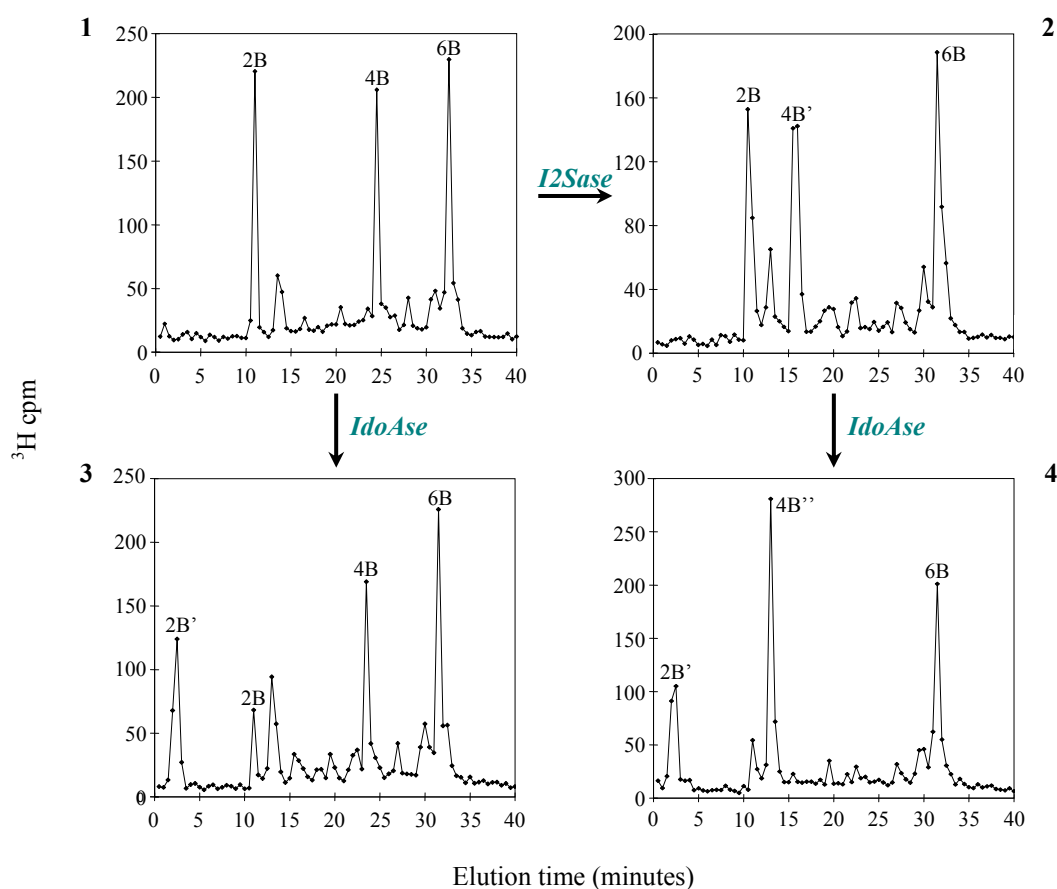
Durant la période où j'ai effectué ma thèse, les recherches menées dans le domaine s'accordaient à reconnaître l'existence au sein des chaînes d'HS de structures saccharidiques spécifiques pour la fixation d'un ligand, et donc pour la régulation d'une fonction donnée. Dès lors, des efforts considérables ont été mis en œuvre pour développer des techniques permettant la caractérisation structurale d'HS. Ceci s'est traduit par la publication dans l'espace de quelques mois de 4 méthodes différentes de séquençage d'oligosaccharides [265-268], dont le *Tritium End Labelling Sequencing* (TELS).

Cette technique, dont un exemple d'application est détaillé Figure 39, implique un marquage spécifique de l'oligosaccharide étudié au niveau de son extrémité réductrice, par un traitement au  $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$ . Cette première étape est particulièrement importante, car elle permet à la fois la détection de l'échantillon (par mesure de la radioactivité) et introduit un cadre de lecture nécessaire à l'analyse. L'échantillon marqué est ensuite soumis à une dégradation ménagée par l'acide nitreux. Celui-ci va conduire à la génération d'un mélange de fragments intermédiaires dont seuls ceux possédant l'extrémité réductrice originale pourront être détectés.

A



B



**Figure 39 : Exemple de séquençage d'un hexasaccharide d'HS (RIdp6B) par le TELS**

**A** : l'oligosaccharide à analyser est tout d'abord marqué au niveau de son extrémité réductrice par réduction au  $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$ , puis traité à l'acide nitreux en conditions douces ( $\text{pHNO}_2$ ) afin de générer un mélange de fragments intermédiaires dont seuls ceux possédant l'extrémité réductrice marquée pourront être détectés.

**B** : le mélange obtenu est analysé en SAX-HPLC. Dans cet exemple, la détection de 3 pics démontre la présence de GlcNS susceptibles à l'acide nitreux en positions 3 et 5 (1). Un traitement de ce mélange par l'IdoAse conduit à un déplacement du pic 2B (en 2B'), identifiant le résidu 2 comme étant un IdoA (2). Une digestion par la I2Sase provoque un déplacement du pic 4B (vers 4B'), indiquant la présence d'un groupement 2S sur le résidu 4 (3), résidu correspondant à un IdoA, comme démontré par l'utilisation séquentielle de ces 2 enzymes (I2Sase puis IdoAse), qui provoque alors un déplacement supplémentaire du pic 4B (vers 4B''), (4). En revanche, une digestion séquentielle par la I2Sase, l'IdoAse, puis la 6Sase, ne conduit à aucune autre modification du profil d'éluion, indiquant l'absence de résidus 6S en position 3.



L'analyse du nombre et de la taille de ces fragments en SAX-HPLC permet alors d'identifier la présence et la position des liaisons GlcNS - HexA sensibles à l'acide nitreux. Par ailleurs, ce mélange de fragments peut également être digéré par différentes exoenzymes lysosomales, telles que la 2-O-sulfatase (I2Sase, [269]), l' $\alpha$ -iduronidase (IdoAse, [270]) ou la glucosamine 6-O-sulfatase (6Sase, [271]), l'analyse des produits de digestion par SAX-HPLC permettant alors d'identifier les résidus internes de l'oligosaccharide étudié.

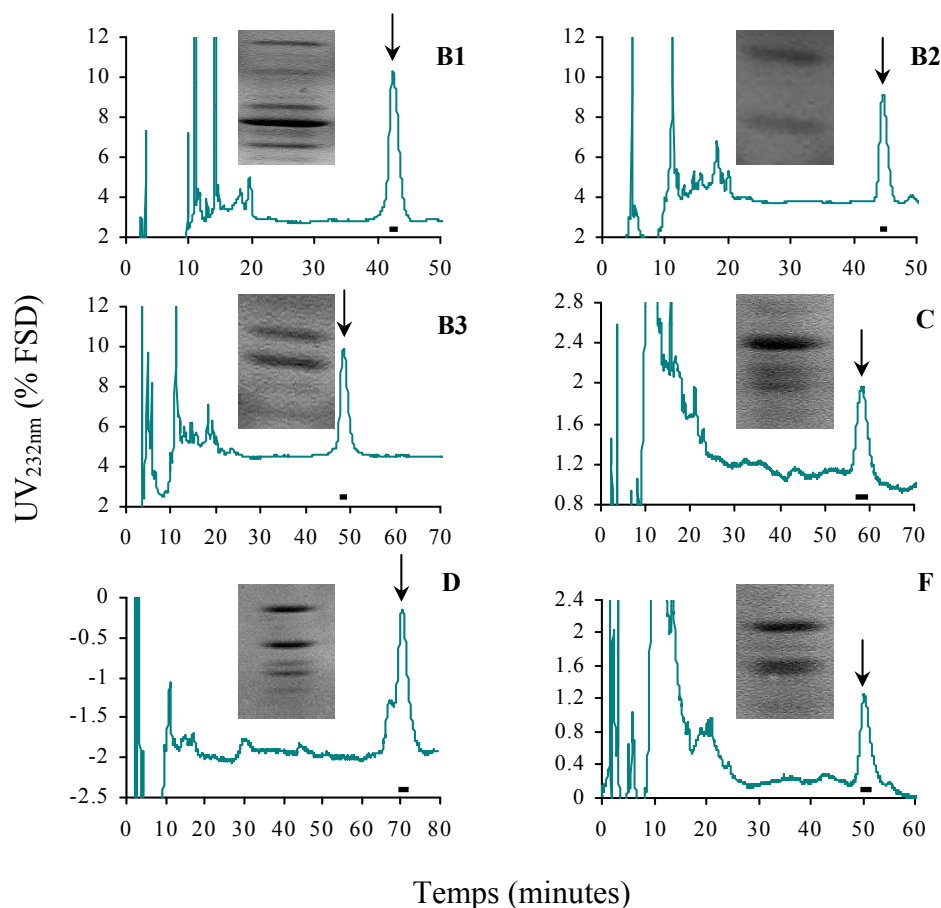
Grâce à cette méthode, nous avons pu pour la première fois réaliser le séquençage complet d'oligosaccharides d'HS et d'héparine, avec des moyens en équipement et matériel de départ extrêmement limités (quelques microgrammes d'oligosaccharides purifiés). Le développement d'un tel outil répondait donc à la très forte demande de l'époque, de la part des milieux scientifiques s'intéressant à l'étude des HS. Cette technique a été par la suite reprise par d'autres laboratoires et a permis l'élucidation de motifs structuraux fins impliqués dans l'activation de facteurs de croissances de la famille des FGFs [272-273].

#### **4.2 PURIFICATION D'OLIGOSACCHARIDES PAR PAGE**

Avec l'avènement de nouvelles techniques de séquençage, un des principaux freins à l'étude des HS résidait alors dans l'absence de techniques efficaces de purification d'oligosaccharides. Nos travaux, notamment sur l'établissement de banques d'oligosaccharides d'HS, nous avaient en effet démontré l'impossibilité de séparer des fragments d'HS de structure voisine par les techniques de purification classiquement utilisées (chromatographie d'exclusion et HPLC échangeuse d'anions). Ceci constituait une limitation importante à toute étude structure/fonction, car nos résultats montraient en parallèle que de faibles variations de séquence saccharidique pouvaient conduire à des propriétés fonctionnelles très différentes, voire antagonistes (voir paragraphe 2.2.4). Les limites de notre protocole de purification sont très bien illustrées par l'analyse en PAGE des échantillons RIIdp10s (Figure 40).

Les résultats montrent un niveau d'hétérogénéité conséquent, malgré les efforts fournis lors de la préparation de cette banque pour arriver à isoler des oligosaccharides avec un très haut degré de pureté. Des pics apparaissant comme simples et bien isolés sur les profils obtenus en SAX-HPLC sont en fait constitués d'une voire deux espèces majoritaires, accompagnée de

plusieurs contaminants minoritaires. La réalisation de ces contrôles nous a en revanche permis de constater les capacités de résolution très intéressantes du PAGE, technique utilisée à des fins analytiques au laboratoire.

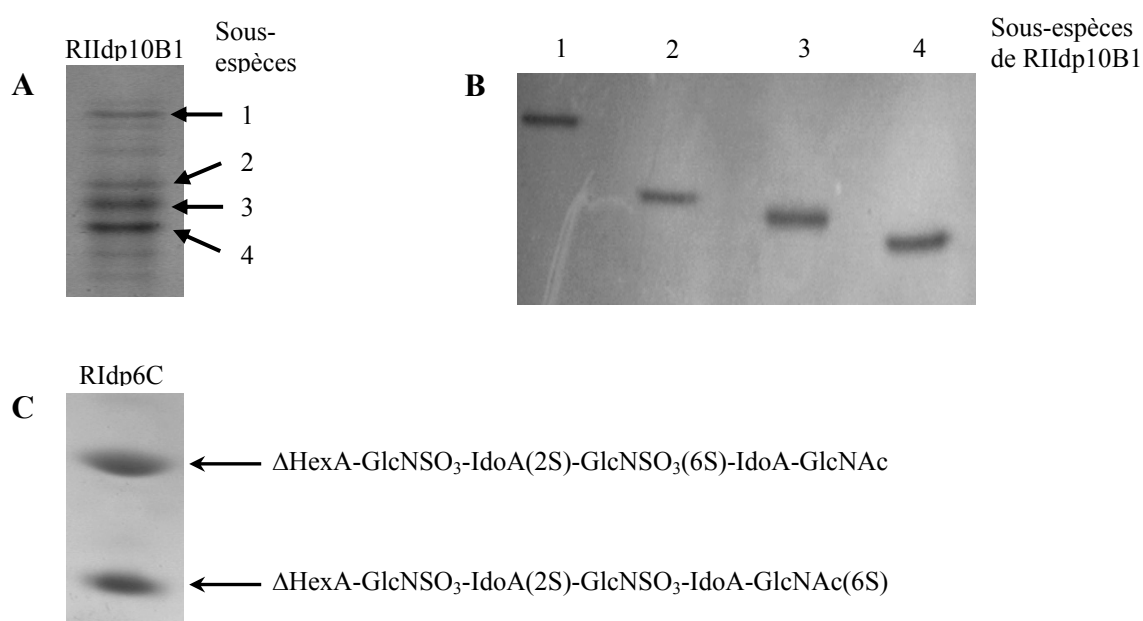


**Figure 40 : Analyse de la pureté des RIIdp10s**

Analyse des RIIdp10s (voir paragraphe 2.2.4) en SAX-HPLC. Pour chacun des oligosaccharides, les fractions ont été rassemblées comme indiqué (■), puis analysées sur gel PAGE (30% acrylamide, voir inserts).

Le principe de séparation par SAX-HPLC se base essentiellement sur la densité de charge. Il est donc probable que des oligosaccharides co-élus diffèrent par la position d'un ou plusieurs groupements sulfate, ou éventuellement la nature des acides uroniques les composant (glucuroniques ou iduroniques). Au contraire, la séparation par PAGE se base à la fois sur la charge et sur la « forme » de la molécule. Il a été montré que la présence d'acide iduronique (pouvant adopter 3 conformations différentes, contre deux pour l'acide glucuronique) contribuait à augmenter la flexibilité des HS [274]. Par ailleurs, la distribution des groupements sulfate le long d'un oligosaccharide va générer des contraintes stériques et

électrostatiques qui vont affecter sa rigidité. Le taux d'épimérisation et le profil de sulfatation sont par conséquent deux paramètres qui devraient fortement influencer la migration des oligosaccharides sur gel d'acrylamide. SAX-HPLC et PAGE présentent donc des propriétés de séparation complémentaires. Sur la base de cette hypothèse, j'ai développé une nouvelle méthode de purification d'oligosaccharides, combinant ces deux techniques. D'un point de vue pratique, les échantillons purifiés par SAX-HPLC sont déssalés, puis mis à migrer sur gel d'acrylamide. Les bandes sont visualisées par coloration à l'Azure A (colorant cationique), découpées, et les oligosaccharides sont élués du gel après broyage mécanique, par une succession de lavages en PBS, puis repurifiés par SAX-HPLC [275]. Cette approche nous a permis de séparer des hexa-, octa- et décasaccharides d'HS, dans des quantités relativement importantes (plusieurs dizaines de microgrammes), avec un degré de pureté jusque là inégalé (Figure 41).



**Figure 41 : Analyse et purification d'oligosaccharides d'HS sur gel d'acrylamide**

**A** : Analyse en PAGE de RIIdp10B1 (voir paragraphe 2.2.4). Les 4 principales sous-espèces sont indiquées par les flèches.

**B** : Analyse en PAGE des sous-espèces de RIIdp10B1, après purification sur gel d'acrylamide.

**C** : Analyse en PAGE RIIdp6C, dont les sous-espèces ont été séquencées par le technique du TELS

Parmi ces exemples, il est intéressant de noter le cas de l'échantillon RIIdp6C (Figure 41C). Celui-ci comprend deux oligosaccharides de structure connue (caractérisés par la technique TELS, voir paragraphe 4.1), qui ne se différencient que par la position d'un groupement 6-O-

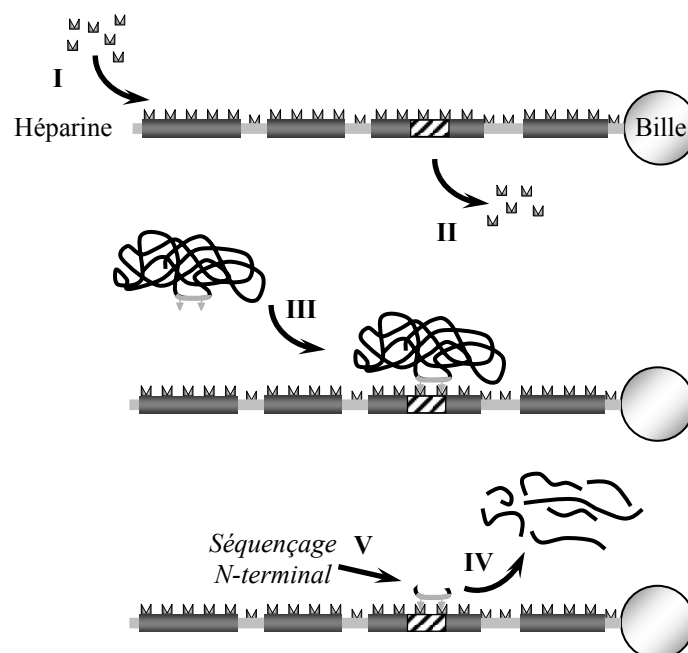
sulfate. La technique de SAX-HPLC ne permet pas de distinguer ces deux espèces, mais celles-ci se démarquent de façon très nette sur gel d'acrylamide. Au regard de l'importance du profil de 6-O-sulfatation pour de nombreuses activités biologiques, y compris l'induction de la réponse au FGF-2 (voir paragraphe 2.3), ces données démontrent donc clairement le fort potentiel du PAGE comme technique de préparation d'oligosaccharides en vue de réaliser des études structure/fonction détaillées.

#### **4.3 IDENTIFICATION DES DOMAINES D'INTERACTION AUX HS SUR LES PROTEINES : LA TECHNIQUE DES « BILLES »**

Plus récemment, nous avons développé une technique innovante, permettant la localisation des domaines d'interaction à l'héparine et aux HS (HBD), sur les protéines (Figure 42). Le principe de cette technique repose sur l'utilisation de billes sur lesquelles sont greffées des chaînes d'héparine. La première étape consiste en une activation des groupements carboxyliques du polysaccharide (Figure 42, I), par incubation avec de l'*N*-hydroxy-sulfosuccinimide (NHS) et du 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Après élimination de l'excès de réactif par lavage des billes (Figure 42, II), celles-ci sont incubées avec la protéine d'intérêt. Cette protéine va reconnaître et interagir avec un motif spécifique du polysaccharide (représenté dans la Figure 42 par un rectangle rayé), fixation entraînant la formation d'un couplage covalent entre les fonctions amines de la protéine et les acides carboxyliques activés (sous forme d'esters succinimide) de l'héparine (Figure 42, III). Le couplage par EDC/NHS n'introduisant pas de bras espaceur, celui-ci ne peut s'effectuer que lorsque la protéine est directement en contact avec le polysaccharide, c'est-à-dire au niveau du site d'interaction. Le système bille d'héparine/protéine peut être soumis à une digestion protéolytique. Les peptides non impliqués dans l'interaction (non couplés à l'héparine) sont libérés et éliminés par lavage des billes, alors que ceux comprenant le site d'interaction demeurent retenus sur le polysaccharide (Figure 42, IV). Ces peptides peuvent alors être identifiés par séquençage N-terminal, réalisé directement sur les billes (Figure 42, V).

Cette approche a été validée par l'étude de deux protéines pour lesquelles le site d'interaction à l'héparine était connu : la chimiokine RANTES et la glycoprotéine d'enveloppe gC du virus de la Pseudorange. Les expériences menées sur ces deux protéines, à l'aide de billes d'héparine

commerciales, ont abouti à l'identification des domaines d'interaction précédemment proposés dans la littérature [237].



**Figure 42 : Principe de la technique des « billes » pour l'identification des acides aminés impliqués dans la fixation aux HS**

Les billes d'héparine sont tout d'abord incubées avec les réactifs EDC/NHS ( **I** ), conduisant à une activation des groupements carboxyliques du polysaccharide (**I**). Après élimination des réactifs en excès par lavage des billes (**II**), celles-ci sont incubées avec la protéine d'intérêt qui va venir se fixer sur un motif saccharidique de l'héparine (**III**). Cette interaction cause la formation de liaisons covalentes entre les amines primaires des Lysines de la protéine (  $\downarrow$  ), et les carboxyles activés du polysaccharide (**III**). Après élimination des protéines non liées, les billes sont soumises à une digestion à la thermolysine. Les peptides libérés sont éliminés par lavage (**IV**), alors que ceux restant couplés à l'héparine (donc impliqués dans l'interaction) sont identifiés par séquençage N-terminal (dégradation d'Edman) réalisé directement sur les billes (**V**).

Lors du développement de la méthode, nous avons pu faire un certain nombre d'observations intéressantes. Tout d'abord, dans tous les exemples testés, aucune séquence irrelevante n'a été identifiée. Ceci est tout particulièrement important car l'utilisation d'un protocole de couplage covalent aurait pu laisser craindre un grand nombre de réactions non-spécifiques. Ceci peut s'expliquer par l'absence de bras espaceur, limitant les possibilités de couplage aux régions d'interface entre la protéine et le polysaccharide, et par l'étape d'activation par le mélange EDC/NHS effectuée seulement sur les billes d'héparine et suivie d'un lavage, afin que la protéine d'intérêt ne soit jamais en contact avec les réactifs libres.

Nous avons également montré que la stratégie de séquençage utilisée permet une identification très aisée des acides aminés directement impliqués dans le couplage. En effet, ces acides aminés ne sont pas libérés en solution par la dégradation d'Edman, ce qui conduit à un « blanc » dans les profils séquentiels d'analyse en HPLC phase inverse. Grâce à cela, nous avons pu observer un couplage de l'héparine sur des résidus Arginines, alors que la formation d'esters succinimide ne devrait s'effectuer que sur les amines primaires des protéines (soit le groupement  $\alpha$ -aminé trouvé en N-ter de la séquence protéique, soit les amines en  $\epsilon$  des chaînes latérales des Lysines). A notre connaissance, ce type de réaction n'avait jamais été reporté auparavant. Une hypothèse serait que l'environnement particulièrement chargé à l'interface protéine/héparine permettrait la réaction de couplage en stabilisant les groupements guanidinium de l'Arginine. Les résultats obtenus avec la protéine gC ont montré que cette technique permettait aussi de caractériser des HBDs « conformationnel », avec l'identification simultanée de deux motifs peptidiques distincts dans la séquence primaire de la protéine. Enfin, nos travaux sur la chimiokine RANTES(9-68) nous ont également permis de distinguer des sites de haute et de basse affinités, en modulant la concentration de protéine incubée avec l'héparine activée. Il est également intéressant de noter que l'utilisation de fortes concentrations de chimiokine (10  $\mu$ M) a conduit à une détection occasionnelle (à une fréquence d'environ 40%) d'un couplage au niveau du résidu K33. Ce résidu, qui n'avait encore jamais été identifié auparavant, pourrait donc être impliqué dans l'interaction avec les HS. A ce sujet, quelques mois après la parution de ces travaux, Shaw *et al.* publiaient la structure par cristallographie aux rayons X d'un complexe de RANTES avec un disaccharide d'héparine, structure dans laquelle des contacts sucre/K33 étaient décrits [276].

Depuis sa mise en place, cette technique a été utilisée avec succès pour la caractérisation des HBDs d'un grand nombre de protéines d'intérêt pour le laboratoire, telles que le fragment a3LG4/5 de la laminine-5, l'AT-III, Prp, ADAM-12 ou la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH (voir paragraphe 3.1.2.3). Pour cette dernière, nous avons adapté le protocole pour une utilisation de l'héparine en solution. Cette alternative est techniquement plus lourde car l'absence d'un support solide complique les phases de lavage et nécessite l'ajout d'une étape de purification des complexes héparine/peptides (par chromatographie échangeuse d'ions). En revanche, elle permet de s'affranchir des billes qui causaient des difficultés pour la réalisation du séquençage d'Edman, et offre la possibilité d'utiliser toute une variété de GAGs différents pour le couplage, y compris des oligosaccharides de structure définie.

## **5 LE FUTUR : MECANISMES DE REGULATION DE L'EXPRESSION ET DE LA STRUCTURE DES HS ET LEURS CONSEQUENCES FONCTIONNELLES**

Au cours de ces 10 années passées à l'IBS, j'ai étudié les interactions protéines/GAG suivant des approches permettant une étude exhaustive des caractéristiques fonctionnelles, structurales et dynamiques de ces interactions *in vitro*. Ces travaux ont clairement démontré leur intérêt et ont fourni des informations précieuses sur le rôle biologique de ces polysaccharides, mais également des données structurales pour le développement de mimétiques de GAGs en vue d'éventuelles applications thérapeutiques. Cependant, ces approches souffrent d'un certain nombre de limitations. Tout d'abord, quelles que soient les techniques utilisées, les études d'interaction que nous menons au laboratoire sont réalisées à l'aide de préparations d'HS ou d'héparine commerciales (généralement issues de muqueuses de porcs), qui ne constituent donc pas le véritable ligand physiologique auquel sont confrontées nos protéines d'intérêt. Si l'utilité de ces sources de GAGs, disponibles en grande quantité, demeure indiscutable, il est néanmoins improbable que celles-ci nous permettent d'étudier des relations structure/fonction à un degré très fin.

Dans ce contexte, le projet de recherche que je me propose de mettre en place durant les années à venir vise à donner à nos analyses d'interaction protéines/GAGs une nouvelle dimension plus intégrée, en associant à nos approches *in vitro* une étude des GAGs exprimés par des cellules relevantes pour le système biologique étudié.

Cette nouvelle orientation constitue un défi méthodologique important. En effet, du fait de leur complexité et de leur diversité, l'analyse structurale des HS cellulaires demeure extrêmement complexe à mettre en œuvre et implique l'utilisation de techniques biochimiques spécifiques et assez complexes (purification du polysaccharide, dépolymérisations spécifiques et caractérisation des produits obtenus...). Ces analyses fournissent des données importantes, mais ne permettent généralement pas la détermination complète des structures saccharidiques fines présentes. En parallèle, de nombreux laboratoires se sont intéressés à l'étude de l'expression des enzymes de biosynthèse des HS, mais les résultats obtenus restent souvent difficiles à interpréter en l'absence de données compositionnelles sur le polysaccharide. Notre objectif est de coupler ces deux approches,

afin d'obtenir des informations structurales beaucoup plus précises sur les HS exprimés par les cellules. Cette stratégie est actuellement mise en place dans le cadre de deux projets de recherche : l'étude du rôle des GAGs dans les mécanismes de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*, et l'analyse des effets de dérivés xylosides sur l'expression et la structure des GAGs dans un modèle de derme humain reconstitué.

Enfin, outre l'étude des caractéristiques biochimiques des GAGs cellulaires et des régulations de leur voie de biosynthèse, nous nous intéresserons également à un troisième niveau de modulation de la structure de ces polysaccharides à la surface cellulaire, à savoir les phénomènes de modifications post-synthétiques que subissent les HS, suite à l'action des enzymes HSulfs.

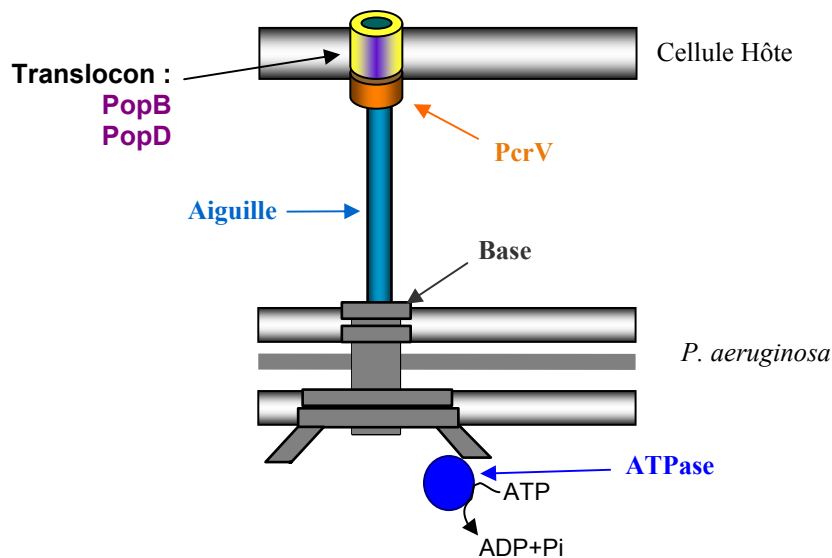
### **5.1 ROLE DES HS DANS LES MECANISMES DE VIRULENCE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à gram négatif, très répandue dans l'environnement. Isolée par Carle Gessard en 1882, elle se caractérise par sa morphologie en bâtonnet d'environ 1µm de long et sa capacité à produire un pigment de couleur bleue, la pyocyanine, lui ayant valu l'appellation de bacille pyocyanique. *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste de l'homme, responsable de nombreuses affections nosocomiales chez les personnes immunodéprimées (malades du SIDA, du Cancer, grands brûlés ...), et principale cause de décès chez les patients atteints de mucoviscidose. Comme beaucoup d'autres bactéries à gram négative, l'infection par *P. aeruginosa* fait intervenir un facteur de virulence majeur de la bactérie : le système de sécrétion de type III (SST3) [277-279].

Le SST3 (Figure 43) est un complexe multi-protéique (plus de 25 protéines différentes impliquées) permettant l'injection de toxines directement dans le cytoplasme de l'hôte et conduisant à la mort cellulaire. La structure du SST3 comprend : une base, constituée de deux ensembles d'anneaux ancrés dans la double membrane bactérienne et d'un cylindre creux traversant le périplasme ; une aiguille d'environ 8 nm de diamètre externe (2 nm de diamètre interne) pour une longueur pouvant atteindre 50 à 80 nm, formée par la polymérisation en hélice d'une petite protéine, PscF [280]. A l'extrémité de cette aiguille se trouve le translocon, structure responsable de l'insertion de l'injectisome dans la membrane de l'hôte. Celui-ci est constitué de 3 protéines : PcrV, PopB et PopD. PcrV est une protéine de 37 kDa, hydrophile,



formant un pentamère à la pointe de l'aiguille du SST3. Comme établi grâce à des souches mutantes, la présence de PcrV est nécessaire à la translocation, bien que celle-ci ne soit pas insérée dans la membrane [281-283]. Cette protéine jouerait donc un rôle d'adaptateur entre l'aiguille et le pore de translocation, celui-ci étant formé par un complexe de protéines PopB et PopD.



**Figure 43 : Structure du SST3 de *Pseudomonas aeruginosa***

Les protéines PopB et PopD, de poids moléculaire 42 et 32 kDa, sont des protéines présentant respectivement deux et un domaines transmembranaires putatifs [284]. Dans le cytoplasme bactérien, celles-ci sont présentes en complexe 1:1 avec leur protéine chaperonne PcrH. Dans le cas de PopD, l'interaction avec PcrH s'effectue au niveau de la région N-terminale de la protéine et d'une partie de son domaine hydrophobe, conduisant ainsi à l'enfouissement de ce dernier dans la chaperonne [284]. Cette interaction permet donc la solubilisation de PopD, sa conservation sous forme monomérique et son maintien dans une conformation partiellement dépliée favorisant sa sécrétion.

La formation de pores de translocation à la surface des cellules demeure un phénomène relativement mal compris et difficile à observer. Cependant des expériences par incubation des protéines Pops (en quantité stœchiométrique) avec des liposomes chargés en fluorochrome ont permis de mettre en évidence, par microscopie électronique à transmission, la formation d'anneaux d'environ 8 nm de diamètre externe (4 nm de diamètre interne)

permettant une fuite de fluorescence [282-283]. De façon remarquable, la capacité à former un pore fonctionnel est inhérente aux deux protéines. Mais l'utilisation d'un mélange de PopB et PopD augmente de manière considérable l'efficacité, indiquant une action en synergie de ces deux protéines [282]. La structure précise du pore de translocation demeure cependant mal définie. Il reste ainsi à déterminer si celui-ci est formé d'un ou de plusieurs anneaux (2 anneaux superposés, par exemple), et si ces anneaux sont des homo- ou des hétéro-oligomères de Pops.

Les partenaires cellulaires permettant l'insertion du pore dans la membrane de l'hôte sont également à identifier. Dans ce cadre, l'utilisation de liposomes de différente nature a toutefois permis de montrer un rôle de certains phospholipides, tels que la phosphatidylsérine, mais pas d'implication du cholestérol [282].

Par ailleurs, des études ont montré que des souris déficientes pour l'expression de Syndecan-1 étaient résistantes à l'infection par *P. aeruginosa* [141]. Le mécanisme impliqué n'est pas clairement élucidé. Cependant, il est intéressant de noter que celui-ci est dépendant de la partie saccharidique du protéoglycane (et non pas du core protéique) et qu'il ne serait pas directement lié à la fixation de la bactérie sur la cellule hôte *via* les HS. Il a été suggéré que la protéase bactérienne *LasA* induirait le shedding de Syndecan-1 et ainsi la dissémination des HS cellulaires dans l'environnement extérieur qui conduirait alors, soit au renforcement des facteurs de virulence bactériens, soit à la répression de mécanismes de défense de l'hôte [141]. D'autres travaux ont par ailleurs montré que les HS pouvaient interagir avec la protéine LcrG, un des constituants du SST3 des *Yersiniae* [285]. Cependant, le rôle joué par les HS dans ce contexte précis demeure également très mal défini. *P. aeruginosa* possède un SST3 très proche de celui des *Yersiniae*. Par analogie, il est donc envisageable que des interactions avec les HS puissent avoir lieu dans le cadre du SST3 de *P. aeruginosa*.

Les travaux de Park *et al.*, s'ils avaient souligné l'importance des HS au cours de l'infection par *P. aeruginosa*, n'avaient cependant pas pu fournir d'éléments précis sur le rôle joué par ces polysaccharides. Le modèle *in vivo* de souris mutantes utilisé ne permettait probablement pas l'examen de ce phénomène au niveau moléculaire, mais l'absence de publications plus récentes venues étayer ces premières observations ne pouvait que suggérer l'existence de mécanismes complexes et atypiques. Dans ce contexte, il semblait intéressant de se demander si les HS ne pourraient pas intervenir indirectement dans l'infection, en promouvant un

facteur de virulence de la bactérie, tel que le SST3. Je suis donc entré en contact avec Eric Faudry et Ina Attrée de l'équipe BBSI du CEA à Grenoble, spécialisés dans l'étude de ce système de sécrétion afin de mettre en place un projet visant à étudier cette hypothèse.

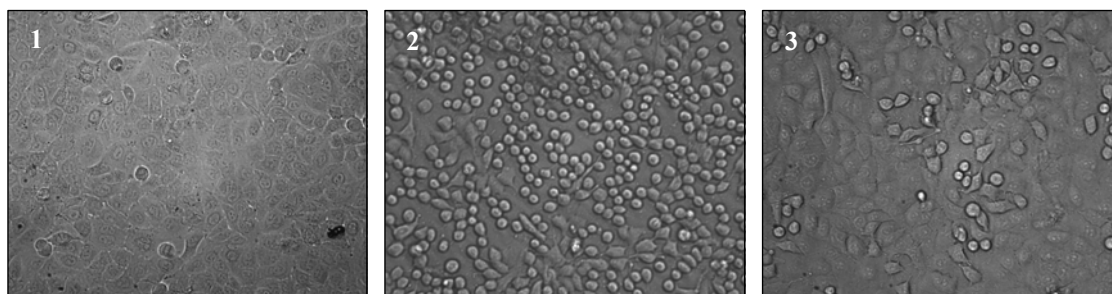
#### **5.1.1 Rôle des HS au cours de l'infection par *P. aeruginosa*.**

Afin d'évaluer l'importance des HS pour le fonctionnement du SST3, un modèle d'infection de cellules épithéliales A549 en culture a été mis en place. Dans les conditions utilisées (durée de l'infection, quantité de bactéries, pré-culture des bactéries en phase exponentielle...), l'infection par *P. aeruginosa* se traduit par un arrondissement des cellules dû à l'injection de toxines bactériennes déstabilisant le cytosquelette, *via* le SST3. Le phénotype « arrondi » est donc un marqueur direct de l'action du système de sécrétion. Ainsi, une expérience d'infection menée dans les mêmes conditions, avec des bactéries mutantes pour les protéines Pops du translocon, ne conduit pas à l'arrondissement des cellules (données non montrées).

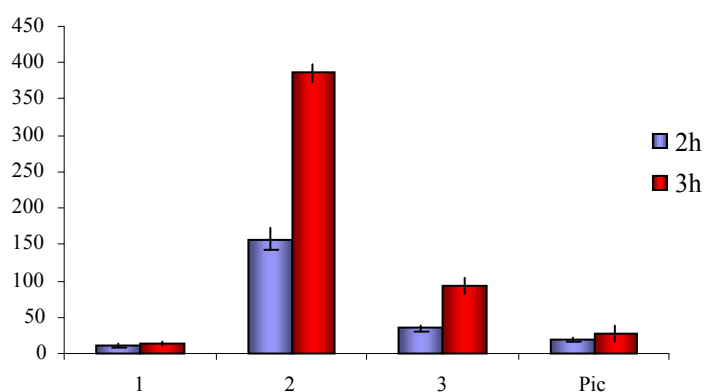
Durant ces expériences, les cellules (cultivées en plaques 96 puits) sont observées au microscope et les cellules rondes sont dénombrées à 2 et 3 heures post-infection (Figure 44). En absence de bactéries, les cellules présentent une morphologie typique (Figure 44A, panel 1). En présence de bactéries, une majorité de cellules arrondies apparaissent sur les champs observés (Figure 44A, panel 2). En revanche, l'élimination des GAGs par un traitement préalable des cellules avec 30 mM de chlorate de sodium conduit à une très forte diminution (78%) du nombre de cellules arrondies (Figure 44A panel 3, et Figure 44B), indiquant une inhibition de l'injection des toxines du SST3. Ces résultats indiquent donc que les GAGs jouent un rôle dans l'action *in vivo* du SST3.

Des résultats très similaires ont également été obtenus avec une autre souche de *P. aeruginosa* (PAO, données non montrées). Par ailleurs, une diminution (à un degré moindre) de l'activité du SST3 a aussi pu être observée après traitement enzymatique des cellules aux héparinases et chondroïtinases (élimination des GAGs cellulaires) ou suite à l'addition d'héparine exogène (compétition avec les GAGs cellulaires). Ces expériences devront néanmoins être répétées afin de confirmer les effets observés.

**A**



**B**



**Figure 44 : Implication des HS dans l'activité du SST3 de *P. aeruginosa***

Etude de l'infection de cellules épithéliales A549 par *P. aeruginosa* (souche CHA) par observation (2h post-infection, A) et quantification (2h et 3h post-infection, B) du « cell rounding », phénomène dû à une déstabilisation du cytosquelette par des toxines bactériennes injectées *via* le SST3.

**1** : Pas d'infection (ou infection avec une souche SST3 (-)).

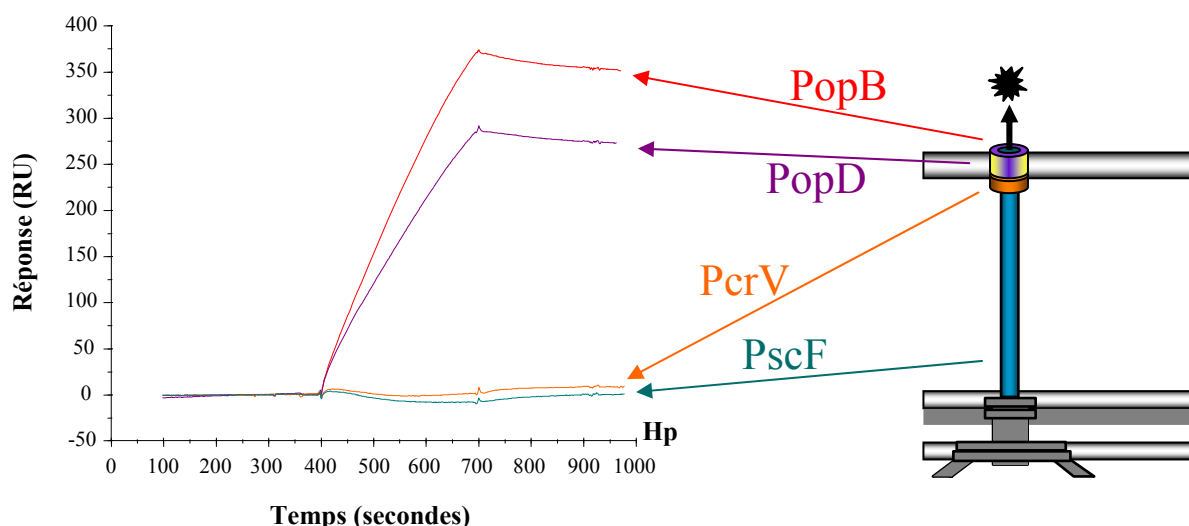
**2** : Infection par la souche CHA.

**3** : Infection, après élimination des HS (traitement au chlorate).

**Pic** : Infection, en présence de Pic (inhibiteurs de protéases) bloquant l'effet du SST3.

### 5.1.2 Analyse de l'interaction des HS avec les protéines du SST3

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à mettre en évidence en BIAcore une éventuelle interaction des HS avec les protéines constituant le SST3. Les protéines PscF, PcrV, PopB et PopD, produites et purifiées à partir de cultures de *P. aeruginosa* dans le laboratoire BBSI, ont été injectées à une concentration de 100 nM sur une surface d'héparine. Les résultats obtenus montrent une absence d'interaction des protéines PscF et PcrV, mais une forte fixation des deux protéines Pop au polysaccharide (Figure 45).

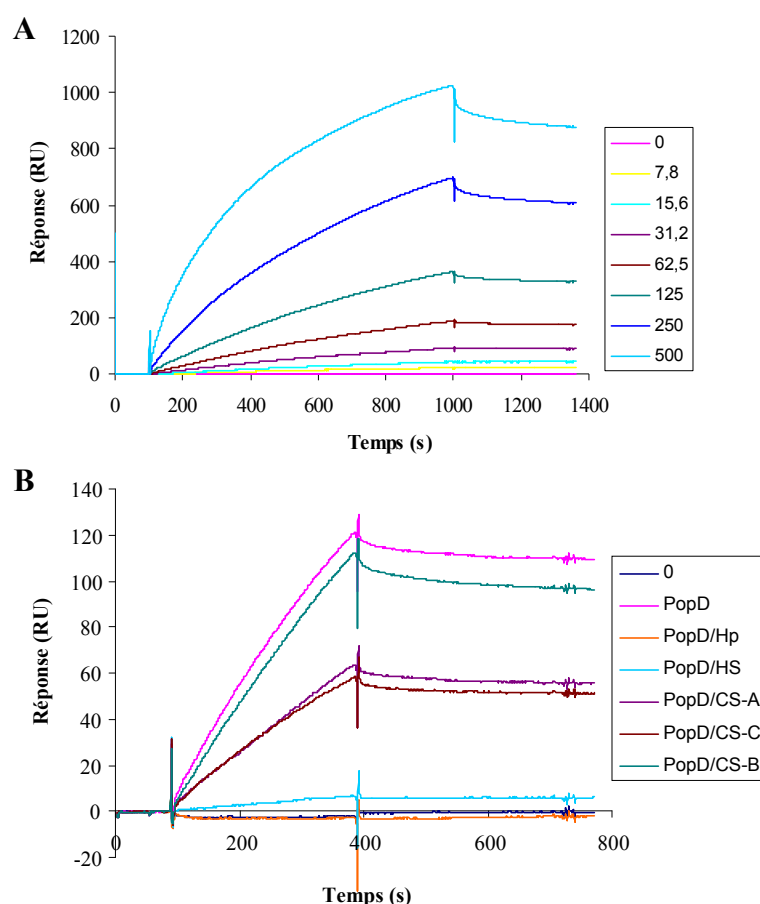


**Figure 45 : Analyse de l'interaction des HS avec les protéines du SST3**

Protéines du SST3 injectées à une concentration de 100 nM sur une surface d'héparine.

Une fois les partenaires moléculaires identifiés, nous avons cherché à déterminer les constantes d'affinité de l'interaction. Pour cela, une série de concentrations des protéines PopB et PopD ont été injectées sur la surface d'héparine. Les sensorgrammes obtenus (Figure 46A) montrent une interaction forte, aboutissant à la formation de complexes très stables (peu de dissociation). L'analyse mathématique de ces données a permis de montrer que cette interaction suivait un modèle de Langmuir (1:1) et de déterminer un  $K_d$  d'environ 40 nM pour PopB et de 80 nM pour PopD. Les mêmes expériences ont également été réalisées sur des surfaces d'HS et ont fourni des résultats similaires.

Une fois démontrée la capacité des HS et de l'héparine à fixer les protéines Pop du SST3, nous avons cherché à étudier la spécificité de cette interaction vis-à-vis d'autres glycosaminoglycanes. Pour cela, des expériences de compétition ont été réalisées en pré-incubant les protéines Pop avec différents types de glycosaminoglycanes, avant de les injecter sur la surface d'héparine. Les résultats obtenus montrent une préférence marquée pour les glycosaminoglycanes de type HS/Héparine, et une capacité d'interaction à un degré moindre, avec des chondroïtines sulfate de type A ou C (Figure 46B).



**Figure 46 : Analyse de la dynamique et de la spécificité de l'interaction PopD/HS en BIAcore**

**A** : Injection d'une série de concentrations de Pop D (0-500 nM) sur une surface d'héparine.

**B** : Injection de PopD (100 nM) en présence de différents types de GAGs (300 nM).

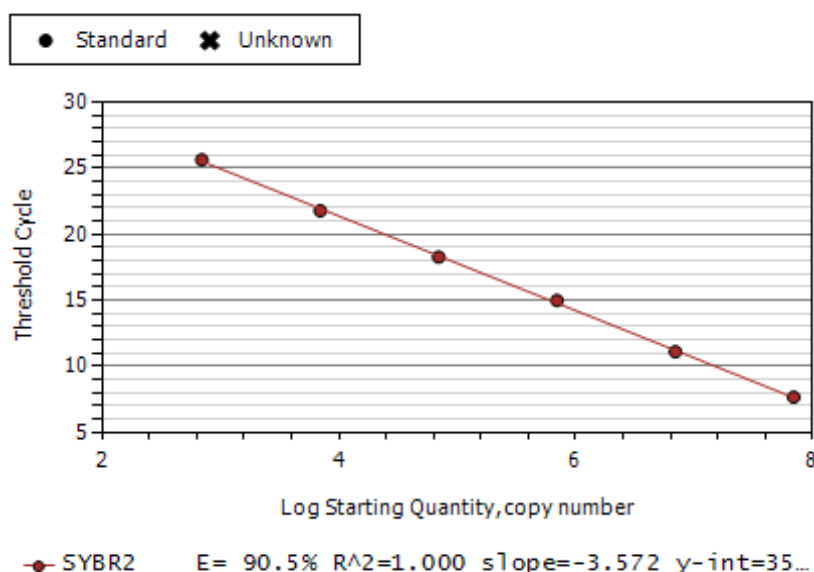
### 5.1.3 Expression et structure des HS au cours de la différenciation des cellules HL-60

Dans le cadre de notre collaboration avec les équipes de I. Attrée et MJ. Rabiet, nous disposons d'un modèle cellulaire particulièrement intéressant pour l'étude de l'infection par *P. aeruginosa*. En effet, les cellules pro-myéloïdes HL-60 présentent une grande résistance à l'infection par *P. aeruginosa*, résistance liée à un blocage (ou une inactivité) du SST3. Cependant, la différenciation de ces cellules vers les lignées neutrophiles ou monocytes/macrophages restaure la sensibilité envers la bactérie. Des travaux préliminaires ont par ailleurs indiqué que ces processus de différenciation s'accompagnaient également de modifications dans l'expression des HS cellulaires. Notre objectif consiste donc à vérifier s'il existe une relation de cause à effet entre ces deux observations, puis à déterminer les spécificités structurales des HS exprimés sur les cellules non-différenciées et différenciées,

afin de mettre en évidence des motifs particuliers pouvant être associés à la reconnaissance et à l'action du SST3.

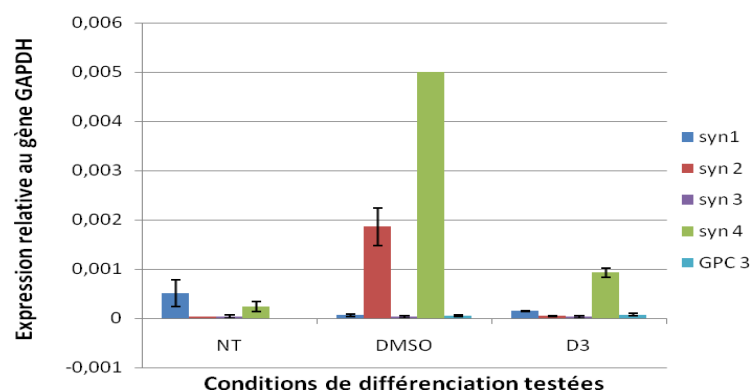
Les travaux sur la caractérisation des HS exprimés au cours de la différenciation des cellules HL-60 ont été initiés. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés à la différenciation induite au moyen de 2 agents chimiques : le DMSO qui oriente la différenciation vers les lignées granulocytes/neutrophiles, et la vitamine D3 conduisant aux lignées de type monocytes. Les protocoles de culture cellulaire, de traitement et de suivi de différenciation (détection de marqueurs spécifiques par FACS) sont maîtrisés et déjà en place dans le laboratoire de nos collaborateurs.

Les premiers résultats obtenus sur ce projet concernent l'approche transcriptionnelle. Des extractions d'ARN à partir des cellules non-différenciées et différenciées ont été réalisées. Les rendements obtenus sont d'environ 15-50 µg d'ARN purifiés à partir de 30-40x10<sup>6</sup> cellules, et répondent donc aux besoins en matériel nécessaires à la RT-PCR. Les ARN ont donc été extraits, purifiés, puis rétro-transcrits en ADNc, aliquotés et congelés. En parallèle, des gammes étalon des gènes étudiés ont été réalisées. Pour ceci, des amplicons ont été produits par PCR classique, quantifiés par mesure d'absorbance, puis utilisés pour effectuer des séries de dilutions qui ont été ensuite analysées en PCR en temps réel (système iQ5, Biorad, Figure 47).



**Figure 47 : Gamme étalon réalisée pour le gène de la GAPDH, utilisé comme gène de ménage**

De telles gammes ont été réalisées pour les 3 gènes de ménage sélectionnés (GAPDH,  $\alpha$ -Tubuline et ARN18S), ainsi que pour les différents gènes cibles étudiés. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à analyser l'expression des 4 membres de la principale famille de protéoglycanes à chaînes d'HS sur la surface cellulaires : les Syndécans. Les résultats obtenus (Figure 48) montrent que la différenciation des cellules HL-60 s'accompagne d'une diminution quasi-totale de l'expression de Syndécan-1 et une augmentation des Syndécans-2 et -4, selon les types de différenciation réalisés. Cette observation est d'autant plus importante que Syndécan-1 a été associée à la permissivité à *P. aeruginosa* [141].

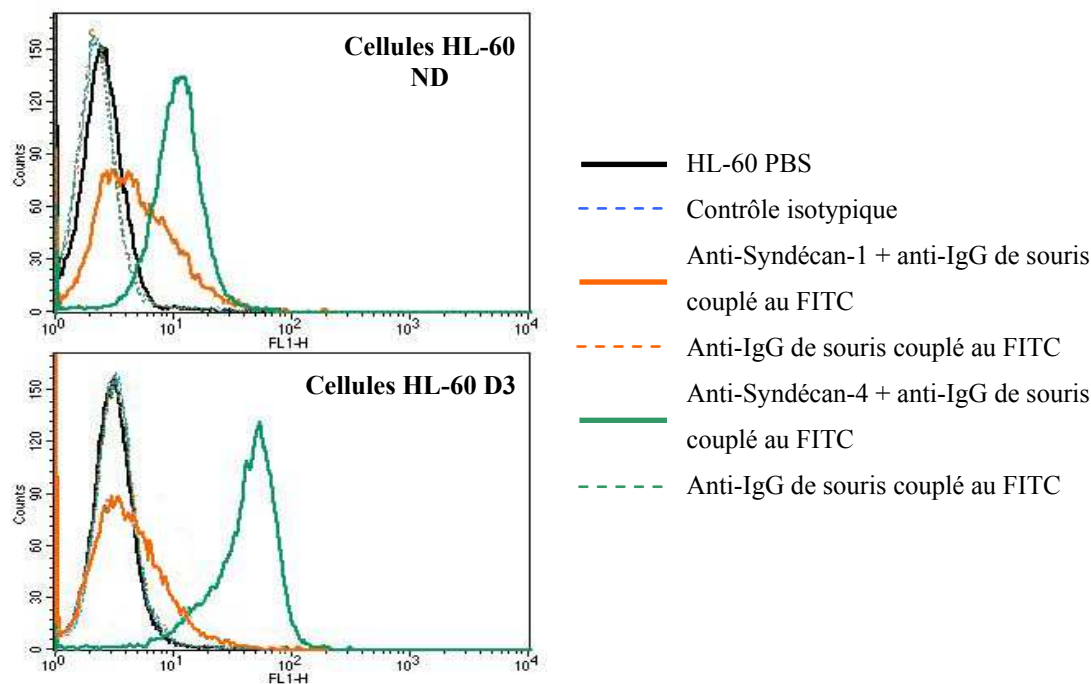


**Figure 48 : Expression des Syndécans au cours de la différenciation des HL-60**

Expression des gènes des Syndécans 1-4 et du Glypican 3, en fonction du gène de la GAPDH, utilisé comme gène de ménage.

Afin de confirmer une partie des données obtenues en q-PCR sur les syndécans, l'expression des Syndécan-1 et -4 à la surface des cellules a été analysée en FACS (Figure 49). Les résultats confirment une diminution de l'expression de Syndécan-1 et une augmentation de Syndécan-4, lors de la différenciation des cellules à la vitamine D3.





**Figure 49 : Analyse en FACS de l'expression des Syndécan-1 et -4 à la surface des HL-60 non différenciées, ou différenciées à la vitamine D3**

#### 5.1.4 Conclusion et perspectives

La suite à donner à ce projet consiste à poursuivre les analyses transcriptionnelles engagées, afin de confirmer les résultats obtenus et d'étendre notre étude à d'autres gènes cibles. Un certain nombre de nouveaux gènes ont déjà été sélectionnés, et les gammes étalons ont été réalisées. Les travaux portant sur l'autre aspect de ce projet, la caractérisation biochimique des GAGs exprimés sur les HL-60, vont être également très prochainement initiés. Pour cela, nous souhaitons mettre en place au laboratoire une approche nouvelle, impliquant une technique de purification accélérée et des analyses basées sur le marquage fluorescent des GAGs purifiés [286-287].

Notre stratégie de recherche, basée sur la combinaison d'analyses transcriptionnelles et biochimiques, devrait fournir des informations précieuses sur l'implication des HS dans les mécanismes d'action du SST3, un des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Alors que la contribution des HS dans les relations Hôte/pathogène était jusque là limitée à un rôle de récepteur d'attachement de faible spécificité, nos travaux devraient mettre à jour un

mode d'action inédit de ces polysaccharides durant l'infection bactérienne. Celui-ci pourrait constituer un nouveau modèle pour l'étude d'autres pathogènes utilisant des systèmes de sécrétion similaires. Par ailleurs, *P. aeruginosa* pose un problème majeur en santé humaine, du fait de sa capacité d'adaptation et de résistance aux antibiotiques. Dans ce contexte, la recherche d'approches thérapeutiques alternatives est essentielle, et la clarification d'un mécanisme important pour la pathogenèse bactérienne pourrait conduire à la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. En parallèle, les informations que nous pourrions obtenir sur les HL-60 devraient permettre d'affiner notre connaissance des particularités structurales des HS exprimés par les cellules de l'immunité et notre compréhension des mécanismes de régulation de la synthèse de ces polysaccharides au cours de la différenciation cellulaire.

Enfin, notre approche qui se base sur l'intégration de données structurales, fonctionnelles et d'informations sur les mécanismes régulateurs des voies de biosynthèse, représente une stratégie d'étude innovante et dont le champ d'application s'étend au-delà du système biologique détaillé dans ce projet. Celui-ci fournit avant tout une base scientifique pour l'établissement au laboratoire d'un modèle de référence et de tout un savoir-faire, qui pourraient être utilisés pour l'étude d'autres processus cellulaires dans lesquels les HS seraient fonctionnellement impliqués (développement, différenciation de cellules souches, cancer, inflammation...).

## **5.2 CARACTERISATION STRUCTURALE DES GLYCOSAMINOGLYCANS DU DERME HUMAIN**

Le derme humain est composé de tissus conjonctifs caractérisés par une abondante matrice extracellulaire, constituée principalement de protéoglycanes, de fibres de collagène et d'élastine, de glycoprotéines de structure et d'eau.

Dans ce tissu particulier, les GAGs jouent un rôle important dans l'architecture et la structure de la matrice. La Décorine, par exemple, est un protéoglycane portant une chaîne unique de dermatane sulfate, capable d'interagir avec les fibrilles de collagène de type I et jouant ainsi un rôle dans la régulation de la taille des faisceaux de collagène. Une autre fonction essentielle des GAGs dans le derme est liée à leurs propriétés de rétention d'eau : les GAGs peuvent en effet capter un volume d'eau 10 000 fois supérieur à leur taille. Ceci serait à l'origine d'une pression de gonflement dans la matrice extracellulaire, permettant ainsi la

diffusion rapide de l'eau et des molécules hydrosolubles. Les GAGs seraient donc fortement impliqués dans le maintien de l'hydratation de la peau tout comme dans le transport des nutriments dans la matrice.

Les principaux GAGs retrouvés au niveau de la peau humaine sont l'acide hyaluronique et les dermatanes sulfate (chondroïtine sulfate B). Les chondroïtines 4- et 6- sulfate (chondroïtine sulfate A et chondroïtine sulfate C, respectivement) sont également présentes mais en plus faible proportion. Des études ont montré que la proportion de GAGs diminuait de façon significative en fonction de l'âge. Cet appauvrissement entraînerait une déshydratation du derme par un apport moindre en eau et des modifications de l'épaisseur cutanée. De par leurs nombreuses fonctions essentielles pour la peau, les GAGs constituent donc une cible privilégiée pour les traitements anti-âge. Dans ce contexte, nous avons récemment mis en place une collaboration avec L'Oréal, afin d'étudier l'effet d'un principe actif « anti-âge », le CX3, sur les GAGs. L'objectif de ce projet est de caractériser les GAGs exprimés dans un modèle de derme reconstitué, traité ou non avec le CX3. Pour cela, nous avons décidé d'appliquer la double approche décrite dans le paragraphe précédent : purification et analyse des GAGs par des techniques biochimiques, et étude au niveau transcriptionnel des profils d'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces polysaccharides. Dans le cadre de ce projet, j'ai supervisé les travaux d'un chercheur en post-doctorat (Emilie Vassal), financé par L'Oréal pour 18 mois au laboratoire.

### **5.2.1 Approche biochimique : purification et caractérisation des GAGs à partir d'un modèle de derme reconstitué**

Des modèles de derme reconstitué (type « éponge ») fournis par l'Oréal, ont été maintenus à 37°C dans du milieu de culture (supplémenté en vitamine C ou non) et traité (ou non) avec 3mM de CX3 (48h). De la glucosamine tritiée (précurseur des GAGs) a alors été ajoutée au milieu de culture et les dermes ont été incubés pour 48 heures supplémentaires. A l'issue de cette étape de marquage, le milieu de culture (contenant les protéoglycanes excrétés) et les dermes (contenant les PG cellulaires et matriciels) ont été récupérés séparément.

Les PGs présents dans le milieu de culture ont pu être directement purifiés par chromatographie échangeuse d'ions, alors que les PGs cellulaires et matriciels ont nécessité

une phase d'extraction préalable, par traitement à la collagénase, puis solubilisation des composants membranaires au triton et à l'urée. La purification des PGs a été réalisée par passage des différentes fractions sur une colonne de DEAE-Sephacel, lavage avec un tampon contenant 0.3 M de NaCl, puis élution sur un gradient de 0.35-0.75 M NaCl. A l'issue de cette étape, les résultats montrent un changement important des profils d'expression des GAGs, d'un point de vue quantitatif (Table 4 et Table 5).

Echantillon	3H (cpm)	% contrôle
C-CX3- (contrôle)	1 780 000	100,00
C+CX3-	1 670 000	93,82
C-CX3+	16 200 000	910,11
C+CX3+	24 300 000	1365,17

**Table 4 : Quantification des PGs purifiés à partir du milieu de culture (en cpm)**

Dermes cultivés en présence (C+) ou en absence (C-) de vitamine C, et traités (CX3+) ou non (CX3-) avec le CX3.

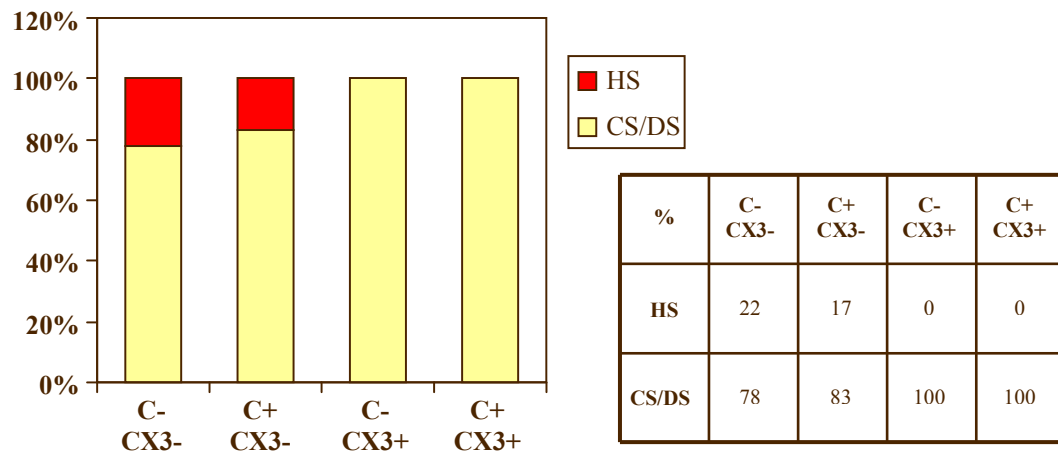
Echantillon	3H (cpm)	% contrôle
C-CX3- (contrôle)	1 570 000	100,00
C+CX3-	7 520 000	478,98
C-CX3+	1 690 000	107,64
C+CX3+	6 810 000	433,75

**Table 5 : Quantification des PGs purifiés à partir des dermes reconstitués (en cpm)**

Dermes cultivés en présence (C+) ou en absence (C-) de vitamine C, et traités (CX3+) ou non (CX3-) avec le CX3.

Le traitement des cellules au CX3 conduit en effet à une augmentation d'un facteur 10 et plus de l'expression des GAGs sécrétés. En revanche, il ne modifie pas de manière sensible la quantité de GAGs associés à la membrane ou à la matrice.

Suite à la purification des PGs, les chaînes de GAGs sont isolées de la partie protéique par réduction alcaline, puis soumises à des digestions par des héparinases ou des chondroïtinases, afin de déterminer leur nature. Les résultats obtenus montrent également un effet qualitatif du dérivé CX3 sur les GAGs sécrétés, avec une disparition des chaînes d'HS, au bénéfice des chaînes de CS/DS (Figure 50).



**Figure 50 : Nature et proportions des chaînes de GAGs isolées à partir du milieu de culture**

Cet effet peut également être observé lorsqu'on analyse la taille des chaînes saccharidiques par chromatographie d'exclusion (calibrage réalisé d'après Wasteson *et al.* [288]) sur colonne CL-6B. Ainsi, en absence de traitement, les chaînes de GAGs sécrétées présentent un poids moléculaire d'approximativement 35 kDa, alors qu'après traitement, les chaînes produites ont un poids moléculaire environ 15 kDa.

Ces analyses (nature et taille des chaînes) restent à effectuer sur les GAGs cellulaires et matriciels. Par ailleurs, une étape déterminante de caractérisation consistera à effectuer une analyse disaccharidique des polysaccharides purifiés, afin d'évaluer l'effet précis de CX3 sur la composition de ces chaînes. Ces travaux sont actuellement en cours.

### **5.2.2 Approche transcriptionnelle : étude de l'expression des protéoglycanes et des enzymes de la biosynthèse des GAGs**

Un des objectifs également poursuivi dans le cadre de ce projet est de réaliser une étude transcriptionnelle des différents protéoglycanes, ainsi que d'enzymes clés de la biosynthèse des GAGs. Avant d'effectuer ces expériences sur un modèle cellulaire aussi complexe que celui des dermes reconstitués, les longues étapes de mise au point que nécessitent les analyses de RT-PCR en temps réel sont actuellement effectuées sur les cellules HL-60, dans le cadre

de notre projet sur *Pseudomonas aeruginosa* (voir paragraphe 5.1.3). En parallèle, nous avons mis au point les conditions d'extraction et de purification des ARN à partir des dermes reconstitués.

### 5.2.3 Conclusion et perspectives

Les travaux actuellement en cours nous ont permis de montrer que le traitement au xyloside CX3 induisait de profonds changements d'expression des GAGs dans notre modèle de derme reconstitué, d'un point de vue quantitatif et d'un point de vue qualitatif. La caractérisation biochimique des GAGs exprimés dans les différentes conditions étudiées (PGs excrétés ou associés à la surface cellulaire, dermes traités ou non à la vitamine C, au xyloside CX3) est en cours d'achèvement. Les derniers résultats obtenus (non montrés dans ce manuscrit) montrent que le CX3 agit également sur la composition et les profils de sulfatation des GAGs associés à la surface cellulaire. Ce résultat est relativement inattendu et extrêmement intéressant. En effet, le mode d'action reconnu des composés de type xyloside est de constituer un précurseur libre permettant l'initiation et la synthèse de GAGs (préférentiellement de CS), et donc la production et l'export de chaînes de GAG non-associées à un core protéique (entraînant donc simplement une augmentation de chaînes de CS retrouvées dans le milieu extracellulaire). La mise en évidence de modifications structurales à la fois sur les chaînes libres et sur les chaînes des protéoglycanes de la surface cellulaire et de la matrice met donc en lumière une nouvelle activité du ProX, agissant comme modulateur de la voie de biosynthèse des GAGs.

Etant donné les très étroites relations structure/fonction observées chez ces polysaccharides, les modifications structurales induites par le CX3 devraient avoir des conséquences fonctionnelles importantes, notamment sur la capacité de ces sucres à interagir avec différentes protéines de structure et de signalisation. Dans ce contexte, nous comptons effectuer un criblage par la technique du « *Filter Binding Assay* », de différents facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines, afin d'identifier des ligands pour lesquels des GAGs issus de dermes traités ou non au CX3 présenteraient des capacités d'interaction différentielles.

La mise en évidence de changements induits par le CX3 dans le répertoire de ligands reconnus par les GAGs devrait contribuer à mieux comprendre les propriétés biologiques de

ce xyloside sur le derme humain, et d'envisager de nouvelles applications cosmétiques ou thérapeutiques.

### ***5.3 ETUDE DE L'ENZYME HSULF ET DE SES EFFETS SUR LA STRUCTURE DES HS CELLULAIRES***

Les multiples fonctions biologiques des HS sont liées à la présence au sein du polysaccharide de régions spécialisées (les domaines S), caractérisées par leur séquence saccharidique et leur profil de sulfatation, et contenant l'information structurale nécessaire à la reconnaissance de leurs ligands. L'expression de tels motifs est étroitement contrôlée lors de la biosynthèse des HS, mais également par l'action d'enzymes de dégradation qui vont venir apporter des modifications structurales supplémentaires, directement à la surface cellulaire. Parmi elles, les Sulfs constituent une famille de sulfatases récemment identifiée [122-123].

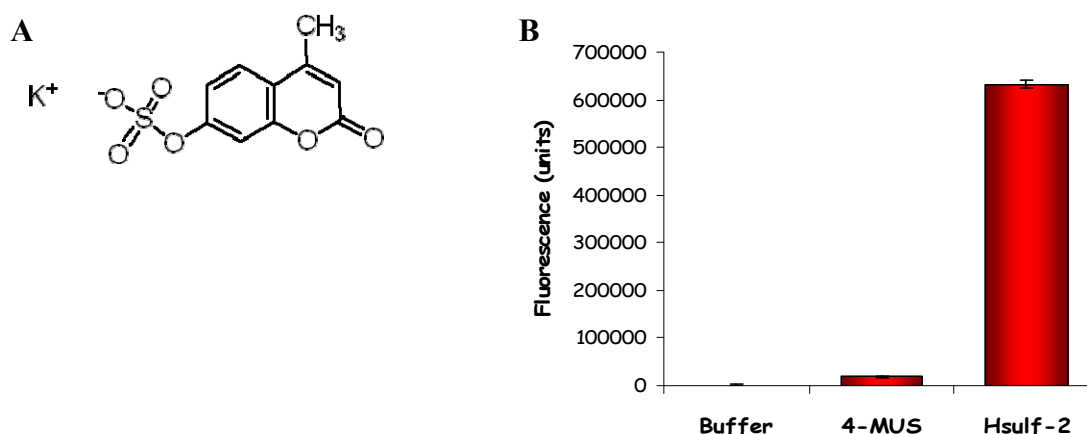
Les Sulfs (2 formes, chez l'homme, HSulf-1 et Hsulf-2) sont des enzymes présentant une activité endo-glucosaminyl-6-O-sulfatase. Elles sont exportées à l'extérieur des cellules où elles vont exercer leur activité sur les HS de la surface cellulaire et des matrices extracellulaires (voir paragraphe 1.3.3.2). De nombreux travaux ont montré qu'en modifiant spécifiquement les profils de 6-O- sulfatation au sein des domaines S des HS, les Sulfs altèrent de façon profonde leurs propriétés biologiques et leur capacité à moduler l'activité d'un grand nombre de facteurs de croissance, de cytokines et de morphogènes [130-131, 289]. Cependant, malgré l'intérêt que représentent les Sulfs pour l'ensemble de ces phénomènes, ces enzymes demeurent très mal connues.

Dans ce contexte, nous avons initié au laboratoire un projet visant à étudier les enzymes HSulf-1 et HSulf-2, afin de définir leurs propriétés structurales et fonctionnelles et de mieux comprendre la manière dont elles catalysent les modifications des profils de 6-O-sulfatation des HS.

### 5.3.1 Mise en place d'un système d'expression de HSulf-2 en cellules HEK

L'expression de HSulf recombinante demeure extrêmement complexe à mettre en œuvre. En effet, la maturation et/ou l'activité des Sulfs dépendent de modifications post-traductionnelles importantes, telles que la transformation d'une cystéine en résidu de formyl-glycine au sein du site catalytique, la N-glycosylation, ou la maturation de l'enzyme *via* des clivages furine-dépendants. Ceci exclut donc la production de HSulf recombinante en bactérie. Nous avons donc mis en place un système d'expression en cellules mammifères de type HEK.

Pour ce faire, le vecteur PcDNA3.1/Myc/His contenant le gène codant pour HSulf-2 a été obtenu auprès du Prof. SD Rosen (UCSF, University of California, USA) et utilisé pour transfecter des cellules « Freestyle 293-F cells » (kit d'expression Invitrogen). Ces cellules ont été choisies car elles peuvent être cultivées à haute densité, en suspension dans du milieu sans sérum. Des expériences de transfection transitoire ont tout d'abord été réalisées et l'expression de HSulf-2 a été mise en évidence par mesure de l'activité enzymatique dans le milieu de culture (Figure 51). Le test permettant cette mesure consiste à incuber du milieu conditionné avec un substrat non-fluorescent, le 4-MUS, converti en produit fluorescent (4-MU) par l'activité aryl-sulfatase des Sulfs.



**Figure 51 : Test d'activité aryl sulfatase**

**A:** structure du 4-MUS.

**B.** Mesure de fluorescence pour le tampon (buffer), le 4-MUS seul (4-MUS), ou le 4-MUS après incubation avec du milieu de culture contenant HSulf-2 (3 heures à 37°C).

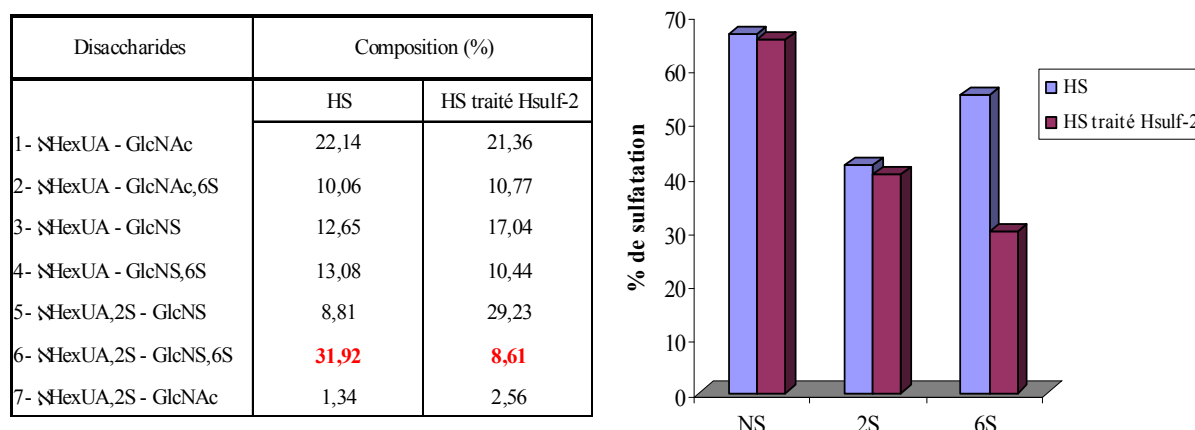


Après avoir vérifié l'expression de l'enzyme, les cellules ont été sélectionnées par addition de généticine dans le milieu de culture, permettant l'obtention de transfectants stables en 3 semaines. Au cours de cette période de sélection, la prolifération cellulaire et l'activité enzymatique présente dans le milieu de culture ont été suivies. Une fois les transfectants stables obtenus, des préparations de milieu conditionné concentré (100X) ont été réalisées afin de mener nos études sur l'activité enzymatique.

### 5.3.2 Etude de l'activité enzymatique de HSulf-2

Les préparations enzymatiques ont été utilisées pour désulfater des chaînes d'HS et d'héparine (Figure 52). Les résultats obtenus (montrés pour les HS) confirment une désulfatation partielle, et essentiellement réalisée au niveau des disaccharides tri-sulfatés [UA(2S) – GlcNS(6S)]. L'analyse de chaînes d'héparine digérées dans les mêmes conditions a abouti à des résultats très similaires (données non montrées).

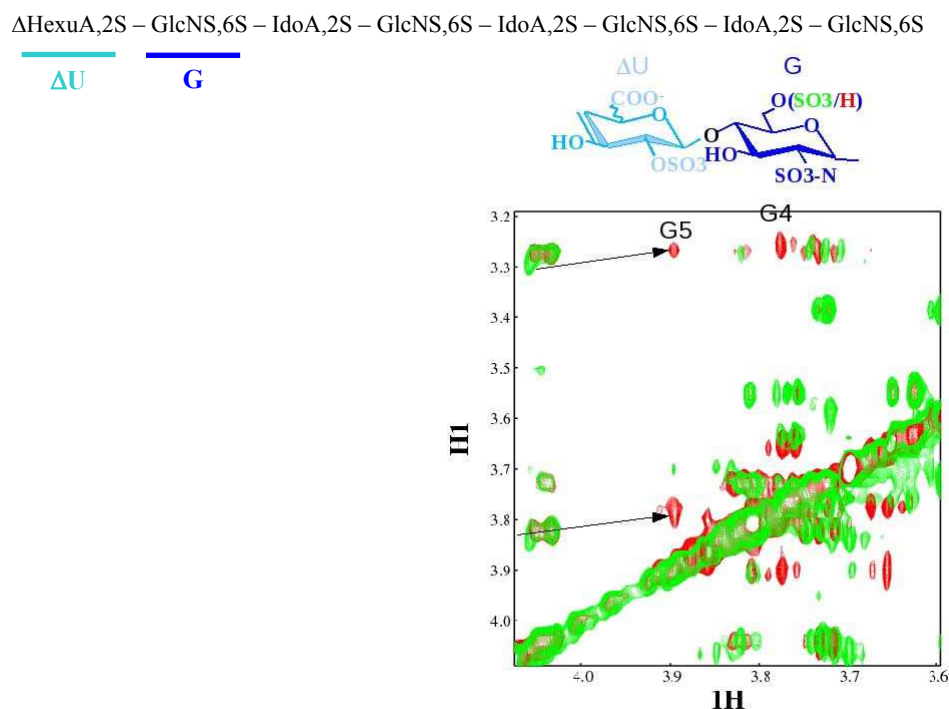
Afin de mieux comprendre le processus de désulfatation catalysé par HSulf-2, nous avons étudié l'effet de l'enzyme sur un oligosaccharide d'héparine nommé H8, de séquence [UA(2S)-GlcNS(6S)]<sub>4</sub>. H8 présente l'avantage d'être constitué d'une succession de disaccharides tri-sulfatés et mime donc les régions internes des domaines S qui sont la cible des Sulfs.



**Figure 52 : Analyse disaccharidique d'HS, avant ou après traitement par HSulf-2**

Analyses disaccharidiques réalisées sur 100  $\mu$ g d'HS (muqueuse de porc), digérés ou non avec 100  $\mu$ l de milieu conditionné 100X contenant HSulf-2 (72h à 37°C).

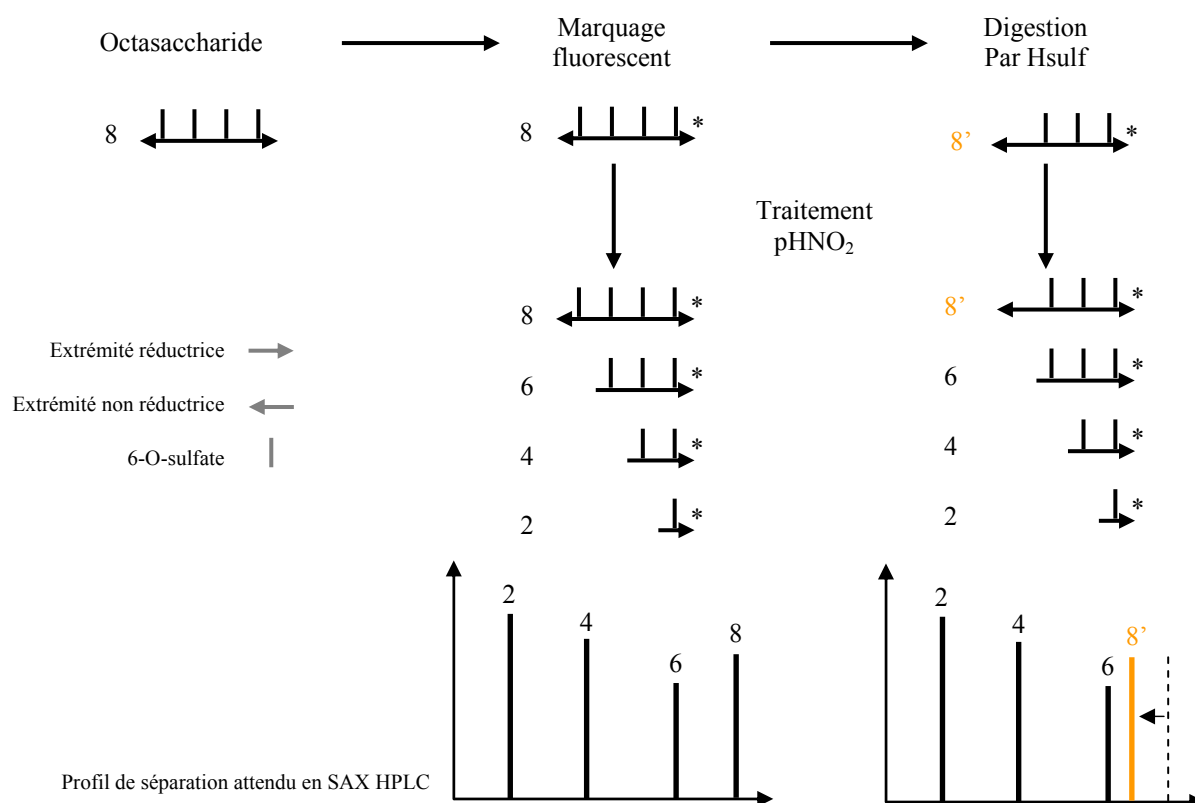
Des digestions partielles de H8 par HSulf-2 ont tout d'abord conduit à l'obtention d'une forme mono-désulfatée. De manière surprenante, l'analyse de ce produit par RMN a révélé que la perte du groupement sulfate était exclusivement localisée à l'extrémité non-réductrice de l'oligosaccharide (Figure 53). De plus, les analyses RMN ont également montré qu'une digestion plus exhaustive de H8 conduisait à la 6-O-désulfatation totale de l'oligosaccharide (données non montrées).



**Figure 53 : Analyse par RMN de l'octasaccharide H8 traité par Hsulf-2**

Ces résultats suggèrent l'existence d'un phénomène de processivité dans l'action de l'enzyme, mécanisme inédit pour une sulfatase. La poursuite de ces travaux vise donc à vérifier la validité de cette hypothèse. Pour cela, nous comptons réaliser des digestions à différents temps, afin d'isoler tous les intermédiaires désulfatés possibles (dans le cas de H8, 4 séquences). Ceux-ci seront alors analysés, grâce à une approche dérivée de notre technique de séquençage d'oligosaccharides précédemment publiée (voir paragraphe 4.1 [268]). Cette méthode implique un marquage au tritium des oligosaccharides au niveau de leur extrémité réductrice, afin de faciliter leur détection et d'introduire un cadre de lecture (Figure 54). Les oligosaccharides sont ensuite dépolymérisés par traitement à l'acide nitreux (coupure au niveau des glucosamines N-sulfatées) en conditions douces, conduisant à la génération de

fragments intermédiaires dont seuls ceux possédant l'extrémité réductrice originale pourront être détectés. L'analyse de ces fragments intermédiaires en HPLC échangeuse d'anion (SAX-HPLC), avant ou après traitement avec HSulf-2, devrait alors permettre de repérer précisément la position ou le groupement sulfate est éliminé.



**Figure 54 : Stratégie d'étude de l'activité enzymatique des HSulfs**

### 5.3.3 Conclusion et perspectives

De par leur implication dans un très grand nombre de processus physiologiques et pathologiques, les Sulfs présentent un intérêt évident en recherche fondamentale et appliquée. Cependant, l'étude de ces enzymes et de leurs mécanismes d'action demeure extrêmement difficile à mettre en œuvre et de ce fait, peu d'informations sont actuellement disponibles, tant au niveau structural que fonctionnel.

Dans ce cadre, nos premiers résultats suggèrent l'existence d'un mode d'action original de ces enzymes, basé sur un mécanisme de processivité. La suite de ces travaux consistera donc à confirmer cette hypothèse et étudier ce phénomène en détail. L'expression de HSulf-1 en

cellules HEK a tout récemment été réalisée (dans les mêmes conditions que HSulf-2), afin d'étudier cette enzyme et de mettre en évidence d'éventuelles spécificités d'action. Nous avons également établi une collaboration avec le Prof T. Dierks (Université de Bielefeld, Allemagne), afin d'obtenir certaines formes mutées de l'enzyme. Enfin, une demande de financement ANR (ANR JCJC SVSE8, projet « SULF ») a été effectuée cette année sur ce projet, proposant le développement de systèmes d'expression plus performants des HSulfs (expression en cellules d'insecte), la mise en place d'études structurales (cristallographie aux rayons X), et le criblage de chimiothèques en vue d'identifier des inhibiteurs des HSulfs, pouvant présenter un intérêt thérapeutique (dans le cadre d'une collaboration avec Caroline Barette, CMBA, CEA, Grenoble).

## 6 CONCLUSION GENERALE

Il y a 10 ans de cela, je concluais le manuscrit de ma thèse en spéculant qu'au vu des récents progrès de la recherche sur les HS, l'identification des motifs saccharidiques spécifiques à l'interaction pour un ligand donné (en particulier le FGF-2) était presque à portée de mains. Dix ans plus tard, cet objectif semble s'être considérablement éloigné, le concept de « séquence unique » est fortement remis en cause, et les relations fines entre structure et fonction des HS demeurent plus que jamais un mystère.

Mais si l'élucidation de ces aspects structure/fonction constitue encore un défi d'une extrême complexité, la recherche sur les HS a tout de même connu des progrès considérables. Tout d'abord, les mécanismes impliqués dans la biosynthèse des GAGs se sont sensiblement clarifiés. Les enzymes et isoformes catalysant les différentes réactions d'assemblage et de maturation de la chaîne saccharidique sont désormais connues, pour la plupart caractérisées, et les efforts portent désormais sur la manière dont ces protéines pourraient s'organiser en complexes supra-moléculaires dans le Golgi. Par ailleurs, l'expression de ces enzymes sous forme recombinante a également permis des ouvertures vers de nouvelles applications, telles que la synthèse chimio-enzymatique d'HS [290-291]. Ces approches innovantes viennent épauler les recherches en synthèse chimique totale qui, tout en demeurant encore extrêmement difficiles à mettre en œuvre, ont connu de réelles avancées, notamment avec le développement de stratégies de synthèse combinatoire [292-294]. Ces aspects pourraient contribuer à débloquent prochainement un important verrou méthodologique, car l'accès à des oligosaccharides (synthétiques ou semi-synthétiques) de séquences variables et définies permettrait d'étudier de façon plus systématique les questions de spécificité dans les relations structure/fonction.

Des progrès considérables ont également été effectués dans l'analyse structurale des HS et de leurs interactions avec les protéines, progrès principalement dus à l'application en glycobiologie de méthodologies empruntées à l'étude des protéines. Ainsi, les techniques de modélisation moléculaire, de RMN, de dichroïsme circulaire ou de cristallographie aux rayons X ont été progressivement adaptées à l'étude des HS et constituent désormais des outils de choix pour la caractérisation structurale de complexes protéines/HS [295-297]. La

résonance plasmonique de surface, le « thermal shift assay » ou l'ITC fournissent des informations supplémentaires sur la dynamique et la stabilité de ces interactions [198, 229, 298-299]. De nouvelles techniques de séquençage d'oligosaccharides par spectrométrie de masse ont été ajoutées à la batterie d'approches « biochimiques » existantes [300]. Enfin, les récents développements en matière de « micro-arrays » ouvrent la voie à des approches de criblage « haut débit » pour l'identification de nouveaux ligands des HS [293, 301-302].

Outre une meilleure connaissance des mécanismes fins régissant les propriétés structurales et fonctionnelles des HS, les progrès scientifiques réalisés ont également ouvert la voie vers l'utilisation d'HS, ou de dérivés d'HS, dans le cadre de nouvelles applications thérapeutiques. Ainsi, l'utilisation de telles molécules a été proposée dans le traitement de pathologies aussi variées que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, certaines formes de Cancer, de maladies inflammatoires ou d'infections, et dans les phénomènes de rejets de greffe [303-305, 306, 307-311].

Cependant, l'émergence de ces nouveaux outils analytiques n'a fait qu'accentuer le découplage entre les connaissances acquises sur les interactions HS/protéines *in vitro* et la réalité physiologique. Les préparations d'héparine et d'HS « commerciales » (généralement d'origine porcine) qui constituent la source de matériel biologique de la plupart des études, n'offrent qu'un éventail restreint de l'infinie diversité structurale que peuvent présenter les HS exprimés par un tissu ou une lignée cellulaire donnée. Ces différences prennent d'autant plus d'importance qu'un grand nombre de fonctions biologiques importantes ont été associées à des motifs saccharidiques « rares » (résidus 3-O-sulfatés ou présentant un groupement  $\text{NH}_3^+$  libre). En parallèle, l'étude phénotypique d'animaux (souris, *C. elegans*, poissons zèbres...) KO pour l'expression de certaines de ces enzymes a soulevé de nouvelles questions et pointé du doigt l'existence probable de phénomènes de compensation, ou d'adaptation à des HS structuralement altérés [101, 193, 312]. Dans ce contexte, seules des analyses fines et détaillées des HS issus de matériel physiologiquement relevant pourront fournir de réelles informations sur les mécanismes impliqués.

Les projets que j'ai récemment initiés et que je souhaite développer dans les années à venir visent à prendre en compte ces considérations et à intégrer mes études structure/fonction dans un contexte physiologique. Ainsi, nos travaux sur les cellules HL-60 et sur les GAGs exprimés dans le derme humain illustrent très bien les profonds changements structuraux qui

peuvent s'opérer suite à l'exposition d'une cellule à un stimulus externe. Ils constituent par ailleurs des modèles d'étude pertinents pour la mise en place et le développement de nos approches transcriptionnelles et biochimiques pour la caractérisation des GAGs cellulaires. A ces travaux viendra s'ajouter un nouveau projet visant à étudier la structure des GAGs au cours du processus de tumorigénèse (Bourse de thèse CIFRE obtenu en Décembre 2010, en partenariat avec la Société Lunginnov). Un des objectifs poursuivis dans le cadre de ces travaux est la mise en évidence de marqueurs saccharidiques pouvant être associés au stade de la progression tumorale. Enfin, l'étude structurale et fonctionnelle des enzymes Sulfs devrait fournir de nouvelles indications sur l'importance biologique de ces processus de modifications post-synthétiques des HS. Les travaux qui seront réalisés dans le cadre de ces projets devraient permettre de mieux appréhender les propriétés structurales et fonctionnelles des HS dans le contexte de la cellule.

## *CURRICULUM VITAE*

### **Romain VIVES**

225, route de Bivan  
38470 L'Albenc  
Tel: 04.76.64.39.85

*Institut de Biologie Structurale  
Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire  
41, rue Horowitz  
38027 Grenoble cedex 01  
Tel : 04.38.78.95.78  
E-mail: romain.vives@ibs.fr*

Né le 22 Novembre 1972 à Mazamet (Tarn), Français  
Deux enfants  
Libéré des obligations militaires (CSN financé par Elf-Sanofi effectué en 1996-1997)

#### **DIPLOMES ET NIVEAU D'ETUDE**

**2000: Doctorat**, Département de Medical Oncology, Paterson Institute for Cancer Research, Université de Manchester, Grande-Bretagne.

**1995: Diplôme d'ingénieur**, Département de Génie Biologique, Institut des Sciences de l'Ingénieur de Clermont-Ferrand (CUST).

**1995: DEA de Biologie**, Option Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

**1990: Baccalauréat**, série C, Académie de Lyon.

#### **EXPERIENCE PROFESSIONNELLE**

**Depuis 2002 : Chargé de Recherche CNRS (1<sup>ère</sup> classe)**, département des Sciences Chimiques, section du Comité National n°16, Institut de Biologie Structurale (UMR 5075), Grenoble, France.

**2000 - 2002 : Stage post-doctoral**, Institut de Biologie Structurale, Grenoble. (Réf. : Dr. H. Lortat-Jacob, lortat@ibs.fr)

**1996 - 1999 : Doctorat**, intitulé « *Rôle des héparanes sulfate dans l'induction de l'activité du bFGF* », département de Medical Oncology, Paterson Institute, Manchester, Grande-Bretagne (Réf. : Prof. J.T. Gallagher, JGallagher@picr.man.ac.uk).

**Langues** : Anglais : courant  
Allemand : notions

**Enseignement** : Responsable d'un cours de Biochimie/Glycobiologie (2H de cours, 1.5H de TD) en Master I de la Faculté de Pharmacie de Grenoble et participation à un module de Master I de l'UFR de biologie de Grenoble (1.5H de cours, 1.5H de TD).

**Encadrement** : Co-directeur d'une thèse (soutenue le 08/02/2008, Université Joseph Fourier, Grenoble), encadrement d'un stage post-doctoral (18 mois). Responsable de stage d'étudiants de tous niveaux (BTS, licence, master I, master II, élèves ingénieurs...).



**Evaluation de la recherche** : Participation à des jurys d'examen (soutenance de stage, M1) à l'UJF, participation à des comités de recrutement de MCU (Universités de Paris XIII et de Nancy).

**Financements** : ANR MIE (Myelo-Pseudo) 2008-2011 (15.600 €) ; ANR PCV (GAG network) 2008-2010 (20.000 €) ; Obtention d'une bourse de thèse CIFRE (2011, partenariat avec la Société Lunginnov).

**Autres** : Participation à la Fête de la Science, prise en charge « d'ateliers découverte » pour lycéens. Membre du comité d'organisation du 6<sup>ème</sup> congrès international sur les protéoglycanes (2009).

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

A. Zaferani, **R. R. Vivès**, P. van der Pol, J. J. Hakvoort, G. J. Navis, H. van Goor, M. R Daha, H. Lortat-Jacob, M.A. Seelen and J. van den Born : "Identification of tubular heparan sulfate as a docking platform for the alternative complement component properdin in proteinuric renal disease". *J. Biol. Chem.* **286**, 5359-67 (2010).

V. Garlatti, A. Chouquet, T. Lunardi, **R. Vives**, H. Paidassi, H. Lortat-Jacob, N.M. Thielens, G.J. Arlaud, C. Gaboriaud : "Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain". *J. Immunol.* **185**, 808-12 (2010).

V. Rossi, I. Bally, S. Ancelet, Y. Xu, V. Fremaux-Bacchi, **R.R. Vivès**, R. Sadir, N. Thielens and G.J. Arlaud : "Functional characterization of the recombinant human C1 inhibitor serpin domain: insights into heparin binding". *J. Immunol.* **184**, 4982-89 (2010).

H.P. Sørensen, **R.R. Vivès**, C. Manetopoulos, R. Albrechtsen, M.C. Lydolph, J. Jacobsen, J.R. Couchman, and U.M. Wewer: "Heparan Sulfate regulates ADAM12 through a Specific Molecular Switch in the PRO domain". *J. Biol. Chem.* **283**, 31920-32 (2008).

E. Crublet, J.P. Andrieu, **R.R. Vivès**, and H. Lortat-Jacob : "The HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120 Features Four Heparan Sulfate Binding Domains, Including the Co-receptor Binding Site.". *J. Biol. Chem.* **283**, 15293-200 (2008).

**R.R Vivès**, H. Lortat-Jacob and P. Fender : "Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors : ally or foe?". *Curr. Gene therap.* **6**, 35-44 (2006).

H. Lortat-Jacob, P. Fender et **R.R Vivès** : "Virus et héparane sulphate : des mécanismes d'adsorption cellulaire à l'entrée virale". *Virologie* **9**, 315-25 (2005).

**R.R Vivès**, A. Imberty, Q. Sattentau and H. Lortat-Jacob : "Heparan sulphate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 co-receptor binding site". *J. Biol. Chem.* **280**, 21353-57 (2005).

S. Mahot, P. Fender, **R.R. Vivès**, C. Caron, M. Perrissin, H. Gruffat, A. Sergeant and E. Drouet : "Cellular uptake of the EBV transcription factor EB1/Zta". *Virus Res.* **110**, 187-93 (2005).

**R.R. Vivès**, E. Crublet, J.P. Andrieu, J. Gagnon, P. Rousselle and H. Lortat-Jacob : "A novel strategy for defining critical amino acid residues involved in protein/glycosaminoglycan interactions". *J. Biol. Chem.* **279**, 54327-33 (2004).

**R.R Vivès**, H. Lortat-Jacob, J. Chroboczek, and P. Fender : "Heparan Sulphate Proteoglycan mediates the selective attachment and internalisation of serotype 3 human adenovirus dodecahedron". *Virology* **321**, 332-40 (2004).

**R.R Vivès**, R. Sadir, A. Imberty and H. Lortat-Jacob : "A Kinetics and modeling study of RANTES (9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization ". *Biochemistry* **41**, 14779-89 (2002).

E.A Stura, L. Martin, H. Lortat-Jacob, **R. Vivès** and C. Vita : "Heparin-aggregated RANTES can be crystallised". *Act. Cryst.* **D58**, 1670-73 (2002).

**R.R Vivès**, S. Goodger and D.A. Pye : “Combined strong anion exchange HPLC and PAGE approach for the purification of heparan sulphate oligosaccharides”. *Biochem. J.* **354**, 141-147 (2001).

D.A Pye, **R.R Vivès**, P. Hyde and J.T Gallagher : “Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2 ”. *Glycobiology* **10**, 1183-92 (2000).

**R.R Vivès**, D.A Pye, M. Salmivirta, J.J Hopwood, U. Lindahl and J.T Gallagher : “Sequence analysis of Heparan Sulphate and Heparin Oligosaccharides”. *Biochem. J.* **339**, 767-73 (1999).

J.T Gallagher, D.A Pye, **R.R Vivès**, P. Hyde and J.E Turnbull : “Heparan sulphate co-receptors: structural determinants for activation of FGF signalling”. *Cell surface proteoglycans in signalling and development*, Eds A. Lander, H. Nakato, S.B Sellek, J.E Turnbull and C. Coath. HFSP, Strasbourg, 53-57 (1999).

D.A Pye, **R.R Vivès**, J.E Turnbull, P. Hyde and J.T Gallagher : “Heparan Sulphate Oligosaccharides Require 6-O-Sulphation for Promotion of bFGF Mitogenic Activity”. *J. Biol. Chem.* **273**, 22936-43 (1998).

## Brevets

**R.R Vivès**, Q. Sattentau, C.Vita, and H. Lortat-Jacob : “Composition anti-VIH, procédé de fabrication et médicament ”. Brevet CNRS-CEA déposé le 19.4.2002 sous le N° 02 04926

## Ouvrages scientifiques

E. Crublet, and **R. R Vivès** : “HS/Protein interactions : tools to decipher the code”. *New developments in therapeutic glycomics*. Ed. Research SignPost, 107-32 (2006).

## Conférences

**2009 : Aix-les-bains** (France) *6th International Conference on Proteoglycans*

**2007 : Rio** (Brésil) *5th International Conference on Proteoglycans*.

**2006 : Nancy** (France) 2<sup>ème</sup> réunion scientifique du Pôle Lorrain d’Ingénierie du Cartilage (PLIC). Une intervention orale en tant que conférencier invité.

**2006 : Lille** (France) Séminaire intitulé “ nouvelles perspectives en protéomique : glycobiologie, préparations d’échantillons en glycoprotéomique ”. Une intervention orale en tant que conférencier invité.

**2006 : Lyon** (France) 6<sup>ème</sup> Colloque de Biologie Cutanée Humaine sur “Glycobiologie cutanée : connaissances actuelles et applications”. Une intervention orale en tant que conférencier invité.

**2005 : Runo** (Suède) Conférence internationale intitulée : “Proteoglycans in Signaling”. Une intervention orale et un poster présenté.

**2004 : Manchester** (Angleterre) *British Society for Matrix Biology Meeting* intitulé : “Grappling with the Glycome”. Une intervention orale et un poster présenté.

**2003 : Parme** (Italie) *3rd International Conference on Proteoglycans* intitulée: “Pathobiology of Proteoglycans”. Un poster présenté.

**2003 : Grenoble** (France) *12<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium*. Un poster présenté.

**2002 : Seillac** (France) *6<sup>th</sup> Jenner Glycobiology and Medicine Symposium* . Un poster présenté.

**2002 : Autrans** (France) Euroconférence intitulée : “Advances in Analytical ultracentrifugation and hydrodynamics”

**2001 : Ambleside** (Angleterre), *53<sup>rd</sup> Harden Conference* intitulée “Proteoglycans : message in the matrix”. Un poster présenté.

**2001 : Autrans** (France) X<sup>ème</sup> Réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif (SFTC). Un poster présenté.

**1999: Stockholm** (Suède), *Wenner-Gren Foundation International Symposium* intitulé “Heparan Sulphate Proteoglycans”. Un intervention orale et deux posters présentés.

**1997: Dundee** (Ecosse), Conférence de la *Biochemical Society* sur “The role of glycosylation in biomolecular interactions”.

**1996: Ghent** (Belgique), Conférence jointe des *Cell-Matrix Interaction Network* et *Belgium Society for Cell biology* intitulée “Heparan Sulphate Proteoglycans in development and malignancy”.

## **ACTIVITES D'ENCADREMENT**

### **Post-doctorat :**

- 2010 : Emilie Vassal, (18 mois). Post-doc financé dans le cadre d'un contrat de collaboration avec l'Oréal sur la « *caractérisation structurale des glycosaminoglycanes du derme humain* ». Deux publications en commun (en préparation).

### **Thèse :**

- 2008 : Elodie Crublet, (4 ans). Thèse intitulée : « *Caractérisation de l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 et les héparanes sulfate : importance des changements conformationnels induits par la liaison à CD4* », soutenue le 08 Février 2008. Co-directeur de thèse. 3 publications en commun.

### **Stages :**

- 2010 : Florian Mallèvre, élève ingénieur/M2, CUST/Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 10 mois.
- 2009 : Léa Moulin, M2 Université Joseph Fourier, 7 mois.
- 2009 : Tiffany Witkowski, M1 Université Joseph Fourier, 2 mois.
- 2008 : Elodie Dutkowski, M1 Université Joseph Fourier, 2 mois.
- 2007 : Julie Venzal, M1 Université Joseph Fourier, 2 mois.
- 2006-2007 : Estelle Grabit, BTS, CFP Moirans, 1 an (alternance). Remercée pour sa participation à une publication.
- 2006 : Julien Perard, M2 Université Joseph Fourier, co-encadrement (7 mois).
- 2005-2006 : Rémi Pagnucco, BTS, CFP Moirans, 2 ans (alternance).
- 2005 : Clothilde Manzano, élève ingénieur, CUST, Clermont-Ferrand, 2 mois.
- 2004 : Géraldine Vélo, M1 Université Joseph Fourier, 2 mois.
- 2003 : Elodie Crublet, élève ingénieur/M2, CUST/Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 10 mois. 1 publication en commun durant cette période.

- 2002 : Audrey Albertini, M1 Université Joseph Fourier, 2 mois.
- 1999 : Sarah Goodger, *Bsc biochemistry* (équivalent M1), University of Manchester, 3 mois.  
Une publication en commun.
- 1998 : Narinder Dass, *Bsc biochemistry* (équivalent M1), University of Manchester, 3 mois.  
Remercié pour sa participation à une publication.

## ***ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT***

- Depuis 2007 : Cours de Glycobiologie (1.5H cours magistral + 1.5H TD), M1 Chimie-Biologie, module BIO415, UFR de Biologie, UJF, Grenoble.
- Depuis 2006 : Cours de Glycobiologie (2H cours magistral + 3H TD), M1 module ISM 407 "Outils moléculaires en médecine", Faculté de Pharmacie, UJF, Grenoble.
- 2005 : Cours sur les Chimiokines (2H cours magistral), M2 Recherche Biologie Santé, Université de Lille.
- 2004-2005: Cours de Glycobiologie (2H cours magistral), M2 Biotechnologies, Santé et Management, Faculté de Pharmacie, UJF, Grenoble.
- 2000 : Cours de Biologie cellulaire (1H30 cours magistral), M2 de Biologie cellulaire et Intégrative, UFR Biologie, UJF, Grenoble.

## ***DIFFUSION DE LA CULTURE SCIENTIFIQUE***

- Participation à 8 conférences nationales et 8 conférences internationales.
- Membre du comité d'organisation de la « *6th International Conference on Proteoglycans* », Aix-les bains, 2009.
- Participation à la fête de la science. Encadrement de groupes de lycéens pour des visites de laboratoires et des ateliers pratiques.
- Accueil d'élèves de 3<sup>ème</sup> dans le cadre de stages « découverte du monde professionnel ».

## ***TRANSFERT TECHNOLOGIQUE, RELATIONS INDUSTRIELLES ET VALORISATION***

### ***Partenariat Laboratoire/Entreprise***

- Dans le cadre de notre projet d'étude des glycosaminoglycanes du derme humain, nous avons établi une collaboration avec la société l'Oréal ayant permis, entre autre, le financement d'un contrat post-doctoral pour 18 mois (2009-2010).

Montant : 130.000 euros.

- Responsable d'une formation auprès de GSK sur les techniques d'analyses disaccharidique de GAGs (2010).

Montant : 4000 euros

### ***Brevet***

**R.R Vivès, Q. Sattentau, C.Vita, and H. Lortat-Jacob** : "Composition anti-VIH, procédé de fabrication et médicament". Brevet CNRS-CEA déposé le 19.4.2002 sous le N° 02 04926

### ***Contrats de Recherche***

- 2011 : Obtention d'un financement de thèse CIFRE (Partenariat avec la Société Lunginnov)

- 2008-2011 : ANR MIE (coordinateur MJ. Rabiet) intitulé « Composants de la cellule hôte conférant la sensibilité à l'injection de toxines pas le système de sécrétion de type III de *Pseudomonas aeruginosa* ». Participation en tant que partenaire.

Montant : 15600 euros.



- 2008-2010 : ANR PCV (Coordinateur S. Fournel-Gigleux) intitulé « Exploration des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse et l'assemblage des glycosaminoglycanes. Impact de la phosphorylation/sulfatation de la chaîne polysaccharidique. Participation en tant que partenaire.

Montant : 20000 euros.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1 Yanagishita, M. (1993) A brief history of proteoglycans. *Experientia*. **49**, 366-368
- 2 Linker, A., Hoffman, P., Sampson, P. and Meyer, K. (1958) Heparitin sulfate. *Biochim Biophys Acta*. **29**, 443-444
- 3 Muir, H. (1958) The nature of the link between protein and carbohydrate of a chondroitin sulphate complex from hyaline cartilage. *Biochem J*. **69**, 195-204
- 4 Roden, L. and Smith, R. (1966) Structure of the neutral trisaccharide of the chondroitin 4-sulfate-protein linkage region. *J Biol Chem*. **241**, 5949-5954
- 5 Petitou, M., Casu, B. and Lindahl, U. (2003) 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie*. **85**, 83-89
- 6 Iozzo, R. V. and San Antonio, J. D. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest*. **108**, 349-355
- 7 Iozzo, R. V. (2005) Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**, 646-656
- 8 Bix, G. and Iozzo, R. V. (2005) Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends Cell Biol*. **15**, 52-60
- 9 Esko, J. D., Kimata, K. and Lindahl, U. (2009) Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition (Varki A, C. R., Esko JD, Freeze H, Hart G, Marth J, ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 10 Bezakova, G. and Ruegg, M. A. (2003) New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**, 295-308
- 11 Burgess, R. W., Skarnes, W. C. and Sanes, J. R. (2000) Agrin isoforms with distinct amino termini: differential expression, localization, and function. *J Cell Biol*. **151**, 41-52
- 12 Wight, T. N. (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*. **14**, 617-623
- 13 Ricciardelli, C., Sakko, A. J., Ween, M. P., Russell, D. L. and Horsfall, D. J. (2009) The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. **28**, 233-245
- 14 Iozzo, R. V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. **67**, 609-652
- 15 Dudhia, J. (2005) Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci*. **62**, 2241-2256
- 16 Roughley, P. J. (2006) The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater*. **12**, 92-101
- 17 Grant, D. S., Yenisey, C., Rose, R. W., Tootell, M., Santra, M. and Iozzo, R. V. (2002) Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene*. **21**, 4765-4777
- 18 Kolb, M., Margetts, P. J., Sime, P. J. and Gauldie, J. (2001) Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **280**, L1327-1334

- 19 Reed, C. C., Waterhouse, A., Kirby, S., Kay, P., Owens, R. T., McQuillan, D. J. and Iozzo, R. V. (2005) Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene*. **24**, 1104-1110
- 20 Santra, M., Reed, C. C. and Iozzo, R. V. (2002) Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem*. **277**, 35671-35681
- 21 Schonherr, E., Sunderkotter, C., Iozzo, R. V. and Schaefer, L. (2005) Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem*. **280**, 15767-15772
- 22 Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L. and Lose, E. J. (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. **8**, 365-393
- 23 Longley, R. L., Woods, A., Fleetwood, A., Cowling, G. J., Gallagher, J. T. and Couchman, J. R. (1999) Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci*. **112** ( Pt 20), 3421-3431
- 24 Woods, A. and Couchman, J. R. (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*. **5**, 183-192
- 25 Kinnunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H. B. and Rauvala, H. (1998) Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J Biol Chem*. **273**, 10702-10708
- 26 Grootjans, J. J., Zimmermann, P., Reekmans, G., Smets, A., Degeest, G., Durr, J. and David, G. (1997) Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 13683-13688
- 27 Cohen, A. R., Woods, D. F., Marfatia, S. M., Walther, Z., Chishti, A. H., Anderson, J. M. and Wood, D. F. (1998) Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells [published erratum appears in *J Cell Biol* 1998 Aug 24;142(4):following 1156]. *J Cell Biol*. **142**, 129-138
- 28 Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L. and Bernfield, M. (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell*. **5**, 797-805
- 29 Salmivirta, M. and Jalkanen, M. (1995) Syndecan family of cell surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. *Experientia*. **51**, 863-872
- 30 David, G., Bai, X. M., Van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J. J. and Van den Berghe, H. (1993) Spatial and temporal changes in the expression of fibroglycan (syndecan-2) during mouse embryonic development. *Development*. **119**, 841-854
- 31 Pierce, A., Lyon, M., Hampson, I. N., Cowling, G. J. and Gallagher, J. T. (1992) Molecular cloning of the major cell surface heparan sulfate proteoglycan from rat liver. *J Biol Chem*. **267**, 3894-3900
- 32 Carey, D. J., Evans, D. M., Stahl, R. C., Asundi, V. K., Conner, K. J., Garbes, P. and Cizmeci Smith, G. (1992) Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*. **117**, 191-201
- 33 Gould, S. E., Upholt, W. B. and Kosher, R. A. (1992) Syndecan 3: a member of the syndecan family of membrane-intercalated proteoglycans that is expressed in high amounts at the onset of chicken limb cartilage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 3271-3275
- 34 Gotte, M. (2003) Syndecans in inflammation. *Faseb J*. **17**, 575-591
- 35 Oh, E. S. and Couchman, J. R. (2004) Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol Cells*. **17**, 181-187

- 36 David, G., Lories, V., Decock, B., Marynen, P., Cassiman, J. J. and Van den Berghe, H. (1990) Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts. *J Cell Biol.* **111**, 3165-3176
- 37 Stipp, C. S., Litwack, E. D. and Lander, A. D. (1994) Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. *J Cell Biol.* **124**, 149-160
- 38 Filmus, J., Shi, W., Wong, Z. M. and Wong, M. J. (1995) Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan. *Biochem J.* **311**, 561-565
- 39 Watanabe, K., Yamada, H. and Yamaguchi, Y. (1995) K-glypican: a novel GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan that is highly expressed in developing brain and kidney. *J Cell Biol.* **130**, 1207-1218
- 40 Veugelers, M., Vermeesch, J., Reekmans, G., Steinfeld, R., Marynen, P. and David, G. (1997) Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family. *Genomics.* **40**, 24-30
- 41 Veugelers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., Bruystens, A. M., Coomans, C., Dürr, J., Vermeesch, J., Marynen, P. and David, G. (1999) Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal Of Biological Chemistry.* **274**, 26968-26977
- 42 Paine Saunders, S., Viviano, B. L. and Saunders, S. (1999) GPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with GPC5 on human chromosome 13. *Genomics.* **57**, 455-458
- 43 De Cat, B. and David, G. (2001) Developmental roles of the glypicans. *Semin Cell Dev Biol.* **12**, 117-125
- 44 Gallagher, J. T. (1996) Heparan sulphate proteoglycans: the control of cell growth. In *Extracellular Matrix* (Cooper, W. D., ed.). pp. 230-245, Harwood academic publishers
- 45 Saunders, S., Paine-Saunders, S. and Lander, A. D. (1997) Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. *Dev Biol.* **190**, 78-93
- 46 Fico, A., Maina, F. and Dono, R. (2007) Fine-tuning of cell signalling by glypicans. *Cell Mol Life Sci*
- 47 Yan, D. and Lin, X. (2008) Opposing roles for glypicans in Hedgehog signalling. *Nat Cell Biol.* **10**, 761-763
- 48 Filmus, J. (2001) Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology.* **11**, 19R-23R
- 49 Kandil, D. H. and Cooper, K. (2009) Glypican-3: a novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma and more. *Adv Anat Pathol.* **16**, 125-129
- 50 Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y. and Nishimura, Y. (2003) Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun.* **306**, 16-25
- 51 Cano Gauci, D. F., Song, H. H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T. D., Grisaru, S., Soon, S., Sedlackova, L., Tanswell, A. K., Mak, T. W., Yeger, H., Lockwood, G. A., Rosenblum, N. D. and Filmus, J. (1999) Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol.* **146**, 255-264
- 52 DeBaun, M. R., Ess, J. and Saunders, S. (2001) Simpson Golabi Behmel syndrome: progress toward understanding the molecular basis for overgrowth, malformation, and cancer predisposition. *Mol Genet Metab.* **72**, 279-286

- 53 Veugelers, M., Vermeesch, J., Watanabe, K., Yamaguchi, Y., Marynen, P. and David, G. (1998) GPC4, the gene for human K-glypican, flanks GPC3 on xq26: deletion of the GPC3-GPC4 gene cluster in one family with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Genomics*. **53**, 1-11
- 54 Gutierrez, J. and Brandan, E. (2010) A novel mechanism of sequestering fibroblast growth factor 2 by glypican in lipid rafts, allowing skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol*. **30**, 1634-1649
- 55 Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **1**, 31-39
- 56 Taylor, D. R., Whitehouse, I. J. and Hooper, N. M. (2009) Glypican-1 mediates both prion protein lipid raft association and disease isoform formation. *PLoS Pathog*. **5**, e1000666
- 57 Lopez Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. and Massague, J. (1994) Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol*. **124**, 557-568
- 58 Massague, J. (1992) Receptors for the TGF-beta family. *Cell*. **69**, 1067-1070
- 59 Andres, J. L., DeFalcis, D., Noda, M. and Massague, J. (1992) Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem*. **267**, 5927-5930
- 60 Sakaguchi, K., Lorenzi, M. V., Bottaro, D. P. and Miki, T. (1999) The acidic domain and first immunoglobulin-like loop of fibroblast growth factor receptor 2 modulate downstream signaling through glycosaminoglycan modification. *Mol Cell Biol*. **19**, 6754-6764
- 61 Takagi, Y., Shrivastav, S., Miki, T. and Sakaguchi, K. (1994) Molecular cloning and expression of the acidic fibroblast growth factor receptors in a rat parathyroid cell line (PT-r). Parathyroid cell-specific calcium-dependent change of ligand accessibility and covalent attachment of heparan sulfate glycosaminoglycan to the receptors. *J Biol Chem*. **269**, 23743-23749
- 62 Milstone, L. M., Hough Monroe, L., Kugelman, L. C., Bender, J. R. and Haggerty, J. G. (1994) Epican, a heparan/chondroitin sulfate proteoglycan form of CD44, mediates cell-cell adhesion. *J Cell Sci*. **107**, 3183-3190
- 63 Taylor, K. R. and Gallo, R. L. (2006) Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J*. **20**, 9-22
- 64 Yurt, R. W., Leid, R. W., Jr. and Austen, K. F. (1977) Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J Biol Chem*. **252**, 518-521
- 65 Kolset, S. O. and Tveit, H. (2008) Serglycin--structure and biology. *Cell Mol Life Sci*. **65**, 1073-1085
- 66 Pejler, G., Abrink, M. and Wernersson, S. (2009) Serglycin proteoglycan: regulating the storage and activities of hematopoietic proteases. *Biofactors*. **35**, 61-68
- 67 Kolset, S. O., Prydz, K. and Pejler, G. (2004) Intracellular proteoglycans. *Biochem J*. **379**, 217-227
- 68 Schick, B. P., Gradowski, J. F. and San Antonio, J. D. (2001) Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells. *Blood*. **97**, 449-458
- 69 Biederbick, A., Licht, A. and Kleene, R. (2003) Serglycin proteoglycan is sorted into zymogen granules of rat pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol*. **82**, 19-29
- 70 Schick, B. P., Ho, H. C., Brodbeck, K. C., Wrigley, C. W. and Klimas, J. (2003) Serglycin proteoglycan expression and synthesis in embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. **1593**, 259-267
- 71 Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Heyden, J. V., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R. and Tonnel, A. B. (1996) ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem*. **271**, 20458-20464

- 72 Grigoriu, B. D., Depontieu, F., Scherpereel, A., Gourcerol, D., Devos, P., Ouatas, T., Lafitte, J. J., Copin, M. C., Tonnel, A. B. and Lassalle, P. (2006) Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* **12**, 4575-4582
- 73 Leroy, X., Aubert, S., Zini, L., Franquet, H., Kervoaze, G., Villers, A., Delehedde, M., Copin, M. C. and Lassalle, P. (2010) Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology.* **56**, 180-187
- 74 Maurage, C. A., Adam, E., Mineo, J. F., Sarrazin, S., Debunne, M., Siminski, R. M., Baroncini, M., Lassalle, P., Blond, S. and Delehedde, M. (2009) Endocan expression and localization in human glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* **68**, 633-641
- 75 Scherpereel, A., Gentina, T., Grigoriu, B., Senechal, S., Janin, A., Tsicopoulos, A., Plenat, F., Bechard, D., Tonnel, A. B. and Lassalle, P. (2003) Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res.* **63**, 6084-6089
- 76 Almog, N., Ma, L., Raychowdhury, R., Schwager, C., Erber, R., Short, S., Hlatky, L., Vajkoczy, P., Huber, P. E., Folkman, J. and Abdollahi, A. (2009) Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res.* **69**, 836-844
- 77 del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J. S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., Penninger, J. and Eichmann, A. (2010) Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood.* **116**, 4025-4033
- 78 Strasser, G. A., Kaminker, J. S. and Tessier-Lavigne, M. (2010) Microarray analysis of retinal endothelial tip cells identifies CXCR4 as a mediator of tip cell morphology and branching. *Blood.* **115**, 5102-5110
- 79 Bechard, D., Gentina, T., Delehedde, M., Scherpereel, A., Lyon, M., Aumercier, M., Vazeux, R., Richet, C., Degand, P., Jude, B., Janin, A., Fernig, D. G., Tonnel, A. B. and Lassalle, P. (2001) Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem.* **276**, 48341-48349
- 80 Sarrazin, S., Lyon, M., Deakin, J. A., Guerrini, M., Lassalle, P., Delehedde, M. and Lortat-Jacob, H. (2010) Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from Endocan, a soluble endothelial proteoglycan. *Glycobiology.* **20**, 1380-1388
- 81 Bechard, D., Scherpereel, A., Hammad, H., Gentina, T., Tsicopoulos, A., Aumercier, M., Pestel, J., Dessaint, J. P., Tonnel, A. B. and Lassalle, P. (2001) Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* **167**, 3099-3106
- 82 Tissier, S., Lancel, S., Marechal, X., Mordon, S., Depontieu, F., Scherpereel, A., Chopin, C. and Neviere, R. (2004) Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock.* **21**, 352-357
- 83 Knudson, W. (1998) The role of CD44 as a cell surface hyaluronan receptor during tumor invasion of connective tissue. *Front Biosci.* **3**, d604-615
- 84 Slevin, M., Krupinski, J., Gaffney, J., Matou, S., West, D., Delisser, H., Savani, R. C. and Kumar, S. (2007) Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol.* **26**, 58-68
- 85 Esko, J. D. and Selleck, S. B. (2002) ORDER OUT OF CHAOS: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate. *Annu Rev Biochem.* **71**, 435-471
- 86 Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (2003) Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* **13**, 605-611
- 87 Lindahl, U. and Li, J. P. (2009) Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications. *Int Rev Cell Mol Biol.* **276**, 105-159

- 88 Merry, C. L. and Gallagher, J. T. (2002) New insights into heparan sulphate biosynthesis from the study of mutant mice. *Biochem Soc Symp*, 47-57
- 89 Brinkmann, T., Weilke, C. and Kleesiek, K. (1997) Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *J Biol Chem*. **272**, 11171-11175
- 90 Kokenyesi, R. and Bernfield, M. (1994) Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem*. **269**, 12304-12309
- 91 Zhang, L. and Esko, J. D. (1994) Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J Biol Chem*. **269**, 19295-19299
- 92 Chen, R. L. and Lander, A. D. (2001) Mechanisms underlying preferential assembly of heparan sulfate on glypican-1. *J Biol Chem*. **276**, 7507-7517
- 93 Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J. C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M. and Fournel-Gigleux, S. (2005) Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem*. **280**, 1417-1425
- 94 Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ujikawa, M., Goto, F., Tamura, J., Neumann, K. W., Ogawa, T. and Sugahara, K. (1997) Regulation of chondroitin sulfate biosynthesis by specific sulfation: acceptor specificity of serum beta-GalNAc transferase revealed by structurally defined oligosaccharides. *Glycobiology*. **7**, 531-537
- 95 Yamada, S., Oyama, M., Yuki, Y., Kato, K. and Sugahara, K. (1995) The uniform galactose 4-sulfate structure in the carbohydrate-protein linkage region of human urinary trypsin inhibitor. *Eur J Biochem*. **233**, 687-693
- 96 Kitagawa, H., Shimakawa, H. and Sugahara, K. (1999) The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J Biol Chem*. **274**, 13933-13937
- 97 Grobe, K., Ledin, J., Ringvall, M., Holmborn, K., Forsberg, E., Esko, J. D. and Kjellen, L. (2002) Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. *Biochim Biophys Acta*. **1573**, 209-215
- 98 Pikas, D. S., Eriksson, I. and Kjellen, L. (2000) Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry*. **39**, 4552-4558
- 99 Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M. and Esko, J. D. (2001) Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *J Biol Chem*. **276**, 5876-5882
- 100 Vanpouille, C., Deligny, A., Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Lienard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D. G. and Allain, F. (2007) The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue. *J Biol Chem*. **282**, 24416-24429
- 101 Li, J. P., Gong, F., Hagner-McWhirter, A., Forsberg, E., Abrink, M., Kisilevsky, R., Zhang, X. and Lindahl, U. (2003) Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J Biol Chem*. **278**, 28363-28366
- 102 Merry, C. L. and Wilson, V. A. (2002) Role of heparan sulfate-2-O-sulfotransferase in the mouse. *Biochim Biophys Acta*. **1573**, 319-327

- 103 Razi, N., Kreuger, J., Lay, L., Russo, G., Panza, L., Lindahl, B. and Lindahl, U. (1995) Identification of O-sulphate substituents on D-glucuronic acid units in heparin-related glycosaminoglycans using novel synthetic disaccharide standards. *Glycobiology*. **5**, 807-811
- 104 Habuchi, H., Nagai, N., Sugaya, N., Atsumi, F., Stevens, R. L. and Kimata, K. (2007) Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality. *J Biol Chem*. **282**, 15578-15588
- 105 Edavettal, S. C., Lee, K. A., Negishi, M., Linhardt, R. J., Liu, J. and Pedersen, L. C. (2004) Crystal structure and mutational analysis of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase Isoform 1. *J Biol Chem*. **279**, 25789-25797
- 106 Moon, A. F., Edavettal, S. C., Krahn, J. M., Munoz, E. M., Negishi, M., Linhardt, R. J., Liu, J. and Pedersen, L. C. (2004) Structural analysis of the sulfotransferase (3-o-sulfotransferase isoform 3) involved in the biosynthesis of an entry receptor for herpes simplex virus 1. *J Biol Chem*. **279**, 45185-45193
- 107 Xu, D., Moon, A. F., Song, D., Pedersen, L. C. and Liu, J. (2008) Engineering sulfotransferases to modify heparan sulfate. *Nat Chem Biol*. **4**, 200-202
- 108 Yanagishita, M. and Hascall, V. C. (1984) Metabolism of proteoglycans in rat ovarian granulosa cell culture. Multiple intracellular degradative pathways and the effect of chloroquine. *J Biol Chem*. **259**, 10270-10283
- 109 Simizu, S., Ishida, K., Wierzbica, M. K. and Osada, H. (2004) Secretion of heparanase protein is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. *J Biol Chem*. **279**, 2697-2703
- 110 Dempsey, L. A., Plummer, T. B., Coombes, S. L. and Platt, J. L. (2000) Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage. *Glycobiology*. **10**, 467-475
- 111 Ihrcke, N. S., Parker, W., Reissner, K. J. and Platt, J. L. (1998) Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *J Cell Physiol*. **175**, 255-267
- 112 Sanderson, R. D., Yang, Y., Suva, L. J. and Kelly, T. (2004) Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biol*. **23**, 341-352
- 113 Vlodavsky, I., Abboud-Jarrous, G., Elkin, M., Naggi, A., Casu, B., Sasisekharan, R. and Ilan, N. (2006) The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. **35**, 116-127
- 114 Ferro, V., Hammond, E. and Fairweather, J. K. (2004) The development of inhibitors of heparanase, a key enzyme involved in tumour metastasis, angiogenesis and inflammation. *Mini Rev Med Chem*. **4**, 693-702
- 115 McKenzie, E. A. (2007) Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. *Br J Pharmacol*. **151**, 1-14
- 116 Miao, H. Q., Liu, H., Navarro, E., Kussie, P. and Zhu, Z. (2006) Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy. *Curr Med Chem*. **13**, 2101-2111
- 117 Goldshmidt, O., Zcharia, E., Cohen, M., Aingorn, H., Cohen, I., Nadav, L., Katz, B. Z., Geiger, B. and Vlodavsky, I. (2003) Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *Faseb J*. **17**, 1015-1025
- 118 McKenzie, E., Tyson, K., Stamps, A., Smith, P., Turner, P., Barry, R., Hircok, M., Patel, S., Barry, E., Stubberfield, C., Terrett, J. and Page, M. (2000) Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun*. **276**, 1170-1177
- 119 Hoogewerf, A. J., Leone, J. W., Reardon, I. M., Howe, W. J., Asa, D., Heinrichson, R. L. and Ledbetter, S. R. (1995) CXC chemokines connective tissue activating peptide-III and neutrophil activating peptide-2 are heparin/heparan sulfate-degrading enzymes. *J Biol Chem*. **270**, 3268-3277



- 120 Bame, K. J. (2001) Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology*. **11**, 91R-98R
- 121 Nasser, N. J. (2008) Heparanase involvement in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci*. **65**, 1706-1715
- 122 Dhoot, G. K., Gustafsson, M. K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M. and Emerson, C. P., Jr. (2001) Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science*. **293**, 1663-1666
- 123 Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S. and Rosen, S. D. (2002) Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *J Biol Chem*. **277**, 49175-49185
- 124 Ohto, T., Uchida, H., Yamazaki, H., Keino-Masu, K., Matsui, A. and Masu, M. (2002) Identification of a novel nonlysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage. *Genes Cells*. **7**, 173-185
- 125 Frese, M. A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W. C. and Dierks, T. (2009) Characterization of the human sulfatase Sulf1 and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain. *J Biol Chem*. **284**, 28033-28044
- 126 Hanson, S. R., Best, M. D. and Wong, C. H. (2004) Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl*. **43**, 5736-5763
- 127 Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L. V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M. and von Figura, K. (2003) Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell*. **113**, 435-444
- 128 Ambasta, R. K., Ai, X. and Emerson, C. P., Jr. (2007) Quail Sulf1 function requires asparagine-linked glycosylation. *J Biol Chem*. **282**, 34492-34499
- 129 Tang, R. and Rosen, S. D. (2009) Functional consequences of the subdomain organization of the sulfs. *J Biol Chem*. **284**, 21505-21514
- 130 Ai, X., Do, A. T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and Emerson, C. P., Jr. (2003) QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J Cell Biol*. **162**, 341-351
- 131 Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z. and Rosen, S. D. (2006) HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem*. **7**, 2
- 132 Freeman, S. D., Moore, W. M., Guiral, E. C., Holme, A. D., Turnbull, J. E. and Pownall, M. E. (2008) Extracellular regulation of developmental cell signaling by XtSulf1. *Dev Biol*. **320**, 436-445
- 133 Lamanna, W. C., Baldwin, R. J., Padva, M., Kalus, I., Ten Dam, G., van Kuppevelt, T. H., Gallagher, J. T., von Figura, K., Dierks, T. and Merry, C. L. (2006) Heparan sulfate 6-O-endosulfatases: discrete in vivo activities and functional co-operativity. *Biochem J*. **400**, 63-73
- 134 Lum, D. H., Tan, J., Rosen, S. D. and Werb, Z. (2007) Gene trap disruption of the mouse heparan sulfate 6-O-endosulfatase gene, Sulf2. *Mol Cell Biol*. **27**, 678-688
- 135 Dai, Y., Yang, Y., MacLeod, V., Yue, X., Rapraeger, A. C., Shriver, Z., Venkataraman, G., Sasisekharan, R. and Sanderson, R. D. (2005) HSulf-1 and HSulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo. *J Biol Chem*. **280**, 40066-40073
- 136 Lemjabbar-Alaoui, H., van Zante, A., Singer, M. S., Xue, Q., Wang, Y. Q., Tsay, D., He, B., Jablons, D. M. and Rosen, S. D. (2009) Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis. *Oncogene*. **29**, 635-646

- 137 Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Bistrup, A., Lum, D. H., Egeblad, M., Boudreau, N., Werb, Z. and Rosen, S. D. (2005) Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer. *Neoplasia*. **7**, 1001-1010
- 138 Narita, K., Staub, J., Chien, J., Meyer, K., Bauer, M., Friedl, A., Ramakrishnan, S. and Shridhar, V. (2006) HSulf-1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis in vivo. *Cancer Res*. **66**, 6025-6032
- 139 Nawroth, R., van Zante, A., Cervantes, S., McManus, M., Hebrok, M. and Rosen, S. D. (2007) Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *PLoS One*. **2**, e392
- 140 Nikolova, V., Koo, C. Y., Ibrahim, S. A., Wang, Z., Spillmann, D., Dreier, R., Kelsch, R., Fischgrabe, J., Smollich, M., Rossi, L. H., Sibrowski, W., Wulfig, P., Kiesel, L., Yip, G. W. and Gotte, M. (2009) Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis*. **30**, 397-407
- 141 Park, P. W., Pier, G. B., Hinkes, M. T. and Bernfield, M. (2001) Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature*. **411**, 98-102
- 142 Hou, S., Maccarana, M., Min, T. H., Strate, I. and Pera, E. M. (2007) The secreted serine protease xHtrA1 stimulates long-range FGF signaling in the early *Xenopus* embryo. *Dev Cell*. **13**, 226-241
- 143 Capila, I. and Linhardt, R. J. (2002) Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. **41**, 391-412
- 144 Petitou, M. and Van Boeckel, C. A. (2004) A Synthetic Antithrombin III Binding Pentasaccharide Is Now a Drug! What Comes Next? *Angew Chem Int Ed Engl*. **43**, 3118-3133
- 145 Rapraeger, A. C., Krufka, A. and Olwin, B. B. (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*. **252**, 1705-1708
- 146 Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P. and Ornitz, D. M. (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. **64**, 841-848
- 147 Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J. C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. **15**, 749-795
- 148 Williams, J. G., Jurkovich, G. J. and Maier, R. V. (1993) Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. *J Surg Res*. **54**, 79-93
- 149 Nacheva, G., Todorova, K., Boyanova, M., Berzal-Herranz, A., Karshikoff, A. and Ivanov, I. (2003) Human interferon gamma: significance of the C-terminal flexible domain for its biological activity. *Arch Biochem Biophys*. **413**, 91-98
- 150 Lortat-Jacob, H., Baltzer, F. and Grimaud, J. A. (1996) Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence. *J Biol Chem*. **271**, 16139-16143
- 151 Lortat-Jacob, H., Brisson, C., Guerret, S. and Morel, G. (1996) Non-receptor-mediated tissue localization of human interferon-gamma: role of heparan sulfate/heparin-like molecules. *Cytokine*. **8**, 557-566
- 152 Lortat-Jacob, H. and Grimaud, J. A. (1991) Interferon-gamma binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located in the C-terminal part of the molecule. *FEBS Lett*. **280**, 152-154
- 153 Handel, T. M., Johnson, Z., Crown, S. E., Lau, E. K. and Proudfoot, A. E. (2005) Regulation of Protein Function by Glycosaminoglycans-as Exemplified by Chemokines. *Annu Rev Biochem*. **74**, 385-410
- 154 Lortat-Jacob, H. (2009) The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate. *Curr Opin Struct Biol*. **19**, 543-548

- 155 Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A. and Wells, T. N. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*. **36**, 13570-13578
- 156 Kuschert, G. S., Coulin, F., Power, C. A., Proudfoot, A. E., Hubbard, R. E., Hoogewerf, A. J. and Wells, T. N. (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*. **38**, 12959-12968
- 157 Proudfoot, A. E., Handel, T. M., Johnson, Z., Lau, E. K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T. N. and Kosco-Vilbois, M. H. (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 1885-1890
- 158 Sweeney, E. A., Lortat-Jacob, H., Priestley, G. V., Nakamoto, B. and Papayannopoulou, T. (2002) Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood*. **99**, 44-51
- 159 Shieh, M. T. and Spear, P. G. (1994) Herpesvirus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heparan sulfate or soluble heparin. *J Virol*. **68**, 1224-1228
- 160 Hsiao, J. C., Chung, C. S. and Chang, W. (1998) Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain. *J Virol*. **72**, 8374-8379
- 161 Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D. and Spear, P. G. (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell*. **99**, 13-22
- 162 Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. and Galloway, P. A. (2001) Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol*. **75**, 9187-9200
- 163 Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. and Galloway, P. A. (2003) Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity*. **18**, 27-39
- 164 Olinger, G. G., Saifuddin, M. and Spear, G. T. (2000) CD4-Negative cells bind human immunodeficiency virus type 1 and efficiently transfer virus to T cells. *J Virol*. **74**, 8550-8557
- 165 Bomsel, M. and Alfsen, A. (2003) Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**, 57-68
- 166 Saidi, H., Magri, G., Nasreddine, N., Requena, M. and Belec, L. (2007) R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission. *Virology*. **358**, 55-68
- 167 Wu, Z., Chen, Z. and Phillips, D. M. (2003) Human Genital Epithelial Cells Capture Cell-Free Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Transmit the Virus to CD4+ Cells: Implications for Mechanisms of Sexual Transmission. *J Infect Dis*. **188**, 1473-1482
- 168 Argyris, E. G., Acheampong, E., Nunnari, G., Mukhtar, M., Williams, K. J. and Pomerantz, R. J. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. *J Virol*. **77**, 12140-12151
- 169 Banks, W. A., Robinson, S. M., Wolf, K. M., Bess, J. W., Jr. and Arthur, L. O. (2004) Binding, internalization, and membrane incorporation of human immunodeficiency virus-1 at the blood-brain barrier is differentially regulated. *Neuroscience*. **128**, 143-153
- 170 Bobardt, M. D., Salmon, P., Wang, L., Esko, J. D., Gabuzda, D., Fiala, M., Trono, D., Van der Schueren, B., David, G. and Galloway, P. A. (2004) Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J Virol*. **78**, 6567-6584

- 171 Argyris, E. G., Kulkosky, J., Meyer, M. E., Xu, Y., Mukhtar, M., Pomerantz, R. J. and Williams, K. J. (2004) The perlecan heparan sulfate proteoglycan mediates cellular uptake of HIV-1 Tat through a pathway responsible for biological activity. *Virology*. **330**, 481-486
- 172 Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albini, A., Noonan, D., d'Adda di Fagagna, F., Giacca, M. and Presta, M. (1997) Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J Biol Chem*. **272**, 11313-11320
- 173 Rusnati, M., Tulipano, G., Spillmann, D., Tanghetti, E., Oreste, P., Zoppetti, G., Giacca, M. and Presta, M. (1999) Multiple interactions of HIV-I Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides. *J Biol Chem*. **274**, 28198-28205
- 174 Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. and Giacca, M. (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*. **276**, 3254-3261
- 175 Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., Atkinson, J. P. and Diamond, M. S. (2007) Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate. *PLoS Pathog*. **3**, e183
- 176 Schmidtchen, A., Frick, I. M. and Bjorck, L. (2001) Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol Microbiol*. **39**, 708-713
- 177 Chen, Y., Hayashida, A., Bennett, A. E., Hollingshead, S. K. and Park, P. W. (2007) Streptococcus pneumoniae sheds syndecan-1 ectodomains through ZmpC, a metalloproteinase virulence factor. *J Biol Chem*. **282**, 159-167
- 178 Park, P. W., Foster, T. J., Nishi, E., Duncan, S. J., Klagsbrun, M. and Chen, Y. (2004) Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by Staphylococcus aureus alpha-toxin and beta-toxin. *J Biol Chem*. **279**, 251-258
- 179 Park, P. W., Pier, G. B., Preston, M. J., Goldberger, O., Fitzgerald, M. L. and Bernfield, M. (2000) Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem*. **275**, 3057-3064
- 180 Thompson, L. D., Pantoliano, M. W. and Springer, B. A. (1994) Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry*. **33**, 3831-3840
- 181 Cardin, A. D. and Weintraub, H. J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis*. **9**, 21-32
- 182 Yamashita, H., Beck, K. and Kitagawa, Y. (2004) Heparin binds to the laminin alpha4 chain LG4 domain at a site different from that found for other laminins. *J Mol Biol*. **335**, 1145-1149
- 183 Kuschert, G. S., Hoogewerf, A. J., Proudfoot, A. E., Chung, C. W., Cooke, R. M., Hubbard, R. E., Wells, T. N. and Sanderson, P. N. (1998) Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8. *Biochemistry*. **37**, 11193-11201
- 184 Mulloy, B. and Linhardt, R. J. (2001) Order out of complexity--protein structures that interact with heparin. *Curr Opin Struct Biol*. **11**, 623-628
- 185 Lortat-Jacob, H., Grosdidier, A. and Imberty, A. (2002) Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 1229-1234
- 186 Ishihara, M. (1994) Structural requirements in heparin for binding and activation of FGF-1 and FGF-4 are different from that for FGF-2. *Glycobiology*. **4**, 817-824
- 187 Pye, D. A., Vives, R. R., Hyde, P. and Gallagher, J. T. (2000) Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. *Glycobiology*. **10**, 1183-1192

- 188 Ye, S., Luo, Y., Lu, W., Jones, R. B., Linhardt, R. J., Capila, I., Toida, T., Kan, M., Pelletier, H. and McKeehan, W. L. (2001) Structural Basis for Interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with Different Heparan Sulfate Motifs(.). *Biochemistry*. **40**, 14429-14439
- 189 Kan, M., Wu, X., Wang, F. and McKeehan, W. L. (1999) Specificity for fibroblast growth factors determined by heparan sulfate in a binary complex with the receptor kinase. *J Biol Chem*. **274**, 15947-15952
- 190 Powell, A. K., Fernig, D. G. and Turnbull, J. E. (2002) Fibroblast Growth Factor Receptors 1 and 2 Interact Differently with Heparin/Heparan Sulfate. IMPLICATIONS FOR DYNAMIC ASSEMBLY OF A TERNARY SIGNALING COMPLEX. *J Biol Chem*. **277**, 28554-28563
- 191 Guimond, S. E. and Turnbull, J. E. (1999) Fibroblast growth factor receptor signalling is dictated by specific heparan sulphate saccharides. *Curr Biol*. **9**, 1343-1346
- 192 Ostrovsky, O., Berman, B., Gallagher, J., Mulloy, B., Fernig, D. G., Delehedde, M. and Ron, D. (2002) Differential effects of heparin saccharides on the formation of specific fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor complexes. *J Biol Chem*. **277**, 2444-2453
- 193 Forsberg, E. and Kjellen, L. (2001) Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *J Clin Invest*. **108**, 175-180
- 194 Shworak, N. W., HajMohammadi, S., de Agostini, A. I. and Rosenberg, R. D. (2003) Mice deficient in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1: normal hemostasis with unexpected perinatal phenotypes. *Glycoconj J*. **19**, 355-361
- 195 Raman, R., Venkataraman, G., Ernst, S., Sasisekharan, V. and Sasisekharan, R. (2003) Structural specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 2357-2362
- 196 Mulloy, B. (2005) The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An Acad Bras Cienc*. **77**, 651-664
- 197 Rahmoune, H., Chen, H. L., Gallagher, J. T., Rudland, P. S. and Fernig, D. G. (1998) Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparan sulfate. *J Biol Chem*. **273**, 7303-7310
- 198 Laguri, C., Sadir, R., Rueda, P., Baleux, F., Gans, P., Arenzana-Seisdedos, F. and Lortat-Jacob, H. (2007) The novel CXCL12gamma isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4. *PLoS One*. **2**, e1110
- 199 Rueda, P., Balabanian, K., Lagane, B., Staropoli, I., Chow, K., Levoye, A., Laguri, C., Sadir, R., Delaunay, T., Izquierdo, E., Pablos, J. L., Lendinez, E., Caruz, A., Franco, D., Baleux, F., Lortat-Jacob, H. and Arenzana-Seisdedos, F. (2008) The CXCL12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One*. **3**, e2543
- 200 Roghani, M., Mansukhani, A., Dell'Era, P., Bellosta, P., Basilico, C., Rifkin, D. B. and Moscatelli, D. (1994) Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J Biol Chem*. **269**, 3976-3984
- 201 Miao, H. Q., Ishai Michaeli, R., Atzmon, R., Peretz, T. and Vlodavsky, I. (1996) Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization, and stimulation of cell proliferation. *J Biol Chem*. **271**, 4879-4886
- 202 Ornitz, D. M., Yaron, A., Flanagan, J. G., Svahn, C. M., Levi, E. and Leder, P. (1992) Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol*. **12**, 240-247

- 203 Spivak Kroizman, T., Lemmon, M. A., Dikic, I., Ladbury, J. E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. and Lax, I. (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*. **79**, 1015-1024
- 204 Kan, M., Wang, F., Xu, J., Crabb, J. W., Hou, J. and McKeethan, W. L. (1993) An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science*. **259**, 1918-1921
- 205 Turnbull, J. E., Fernig, D. G., Ke, Y., Wilkinson, M. C. and Gallagher, J. T. (1992) Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J Biol Chem*. **267**, 10337-10341
- 206 Maccarana, M., Casu, B. and Lindahl, U. (1993) Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of basic fibroblast growth factor [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Feb 4;269(5):3903]. *J Biol Chem*. **268**, 23898-23905
- 207 Habuchi, H., Suzuki, S., Saito, T., Tamura, T., Harada, T., Yoshida, K. and Kimata, K. (1992) Structure of a heparan sulphate oligosaccharide that binds to basic fibroblast growth factor. *Biochem J*. **285**, 805-813
- 208 Ishihara, M., Shaklee, P. N., Yang, Z., Liang, W., Wei, Z., Stack, R. J. and Holme, K. (1994) Structural features in heparin which modulate specific biological activities mediated by basic fibroblast growth factor. *Glycobiology*. **4**, 451-458
- 209 Lyon, M. and Gallagher, J. T. (1998) Bio-specific sequences and domains in heparan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion. *Matrix Biol*. **17**, 485-493
- 210 Walker, A., Turnbull, J. E. and Gallagher, J. T. (1994) Specific heparan sulfate saccharides mediate the activity of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. **269**, 931-935
- 211 Ishihara, M., Tyrrell, D. J., Stauber, G. B., Brown, S., Cousens, L. S. and Stack, R. J. (1993) Preparation of affinity-fractionated, heparin-derived oligosaccharides and their effects on selected biological activities mediated by basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. **268**, 4675-4683
- 212 Gambarini, A. G., Miyamoto, C. A., Lima, G. A., Nader, H. B. and Dietrich, C. P. (1993) Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Mol Cell Biochem*. **124**, 121-129
- 213 Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B. B., Lindahl, U. and Rapraeger, A. C. (1993) Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4. *J Biol Chem*. **268**, 23906-23914
- 214 Ornitz, D. M., Herr, A. B., Nilsson, M., Westman, J., Svahn, C. M. and Waksman, G. (1995) FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. *Science*. **268**, 432-436
- 215 Ishihara, M., Takano, R., Kanda, T., Hayashi, K., Hara, S., Kikuchi, H. and Yoshida, K. (1995) Importance of 6-O-sulfate groups of glucosamine residues in heparin for activation of FGF-1 and FGF-2. *J Biochem Tokyo*. **118**, 1255-1260
- 216 Rusnati, M., Coltrini, D., Caccia, P., Dell'Era, P., Zoppetti, G., Oreste, P., Valsasina, B. and Presta, M. (1994) Distinct role of 2-O-, N-, and 6-O-sulfate groups of heparin in the formation of the ternary complex with basic fibroblast growth factor and soluble FGF receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun*. **203**, 450-458
- 217 Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J. and Rees, D. C. (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science*. **271**, 1116-1120
- 218 Moy, F. J., Safran, M., Seddon, A. P., Kitchen, D., Bohlen, P., Aviezer, D., Yayon, A. and Powers, R. (1997) Properly oriented heparin-decasaccharide-induced dimers are the biologically active form of basic fibroblast growth factor [published erratum appears in *Biochemistry* 1997 Jun 24;36(25):7936]. *Biochemistry*. **36**, 4782-4791

- 219 Schlessinger, J., Plotnikov, A. N., Ibrahimi, O. A., Eliseenkova, A. V., Yeh, B. K., Yayon, A., Linhardt, R. J. and Mohammadi, M. (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*. **6**, 743-750
- 220 Pellegrini, L., Burke, D. F., von Delft, F., Mulloy, B. and Blundell, T. L. (2000) Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature*. **407**, 1029-1034
- 221 Pellegrini, L. (2001) Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol*. **11**, 629-634
- 222 Harmer, N. J., Ilag, L. L., Mulloy, B., Pellegrini, L., Robinson, C. V. and Blundell, T. L. (2004) Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. *J Mol Biol*. **339**, 821-834
- 223 Wu, Z. L., Zhang, L., Yabe, T., Kuberan, B., Beeler, D. L., Love, A. and Rosenberg, R. D. (2003) The involvement of heparan sulfate in FGF1/HS/FGFR1 signaling complex. *J Biol Chem*. **278**, 17121-17129
- 224 Delehedde, M., Lyon, M., Gallagher, J. T., Rudland, P. S. and Fernig, D. G. (2002) Fibroblast growth factor-2 binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates a sustained phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and proliferation of rat mammary fibroblasts. *Biochem J*. **366**, 235-244
- 225 Goodger, S. J., Robinson, C. J., Murphy, K. J., Gasiunas, N., Harmer, N. J., Blundell, T. L., Pye, D. A. and Gallagher, J. T. (2008) Evidence that heparin saccharides promote FGF2 mitogenesis through two distinct mechanisms. *J Biol Chem*. **283**, 13001-13008
- 226 Mahot, S., Fender, P., Vives, R. R., Caron, C., Perrissin, M., Gruffat, H., Sergeant, A. and Drouet, E. (2005) Cellular uptake of the EBV transcription factor EB1/Zta. *Virus Res*. **110**, 187-193
- 227 Sorensen, H. P., Vives, R. R., Manetopoulos, C., Albrechtsen, R., Lydolph, M. C., Jacobsen, J., Couchman, J. R. and Wewer, U. M. (2008) Heparan sulfate regulates ADAM12 through a molecular switch mechanism. *J Biol Chem*. **283**, 31920-31932
- 228 Garlatti, V., Chouquet, A., Lunardi, T., Vives, R., Paidassi, H., Lortat-Jacob, H., Thielens, N. M., Arlaud, G. J. and Gaboriaud, C. (2010) Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain. *J Immunol*. **185**, 808-812
- 229 Rossi, V., Bally, I., Ancelet, S., Xu, Y., Fremeaux-Bacchi, V., Vives, R. R., Sadir, R., Thielens, N. and Arlaud, G. J. (2010) Functional characterization of the recombinant human C1 inhibitor serpin domain: insights into heparin binding. *J Immunol*. **184**, 4982-4989
- 230 Chan, D. C. and Kim, P. S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell*. **93**, 681-684
- 231 Dimitrov, D. S. (1997) How do viruses enter cells? The HIV coreceptors teach us a lesson of complexity. *Cell*. **91**, 721-730
- 232 Michael, N. L. and Moore, J. P. (1999) HIV-1 entry inhibitors: evading the issue. *Nat Med*. **5**, 740-742
- 233 Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. and Norcross, M. A. (1995) Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol*. **69**, 2233-2239
- 234 Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol*. **74**, 1948-1960
- 235 Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody [see comments]. *Nature*. **393**, 648-659

- 236 Vives, R. R., Imberty, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. *J Biol Chem.* **280**, 21353-21357
- 237 Vives, R. R., Crublet, E., Andrieu, J. P., Gagnon, J., Rousselle, P. and Lortat-Jacob, H. (2004) A novel strategy for defining critical amino acid residues involved in protein/glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem.* **279**, 54327-54333
- 238 Pasquato, A., Dettin, M., Basak, A., Gambaretto, R., Tonin, L., Seidah, N. G. and Di Bello, C. (2007) Heparin enhances the furin cleavage of HIV-1 gp160 peptides. *FEBS Lett.* **581**, 5807-5813
- 239 Crublet, E., Andrieu, J. P., Vives, R. R. and Lortat-Jacob, H. (2008) The HIV-1 envelope glycoprotein gp120 features four heparan sulfate binding domains, including the co-receptor binding site. *J Biol Chem.* **283**, 15193-15200
- 240 Baleux, F., Loureiro-Morais, L., Hersant, Y., Clayette, P., Arenzana-Seisdedos, F., Bonnaffe, D. and Lortat-Jacob, H. (2009) A synthetic CD4-heparan sulfate glycoconjugate inhibits CCR5 and CXCR4 HIV-1 attachment and entry. *Nat Chem Biol.* **5**, 743-748
- 241 Fender, P., Ruigrok, R. W., Gout, E., Buffet, S. and Chroboczek, J. (1997) Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol.* **15**, 52-56
- 242 Fender, P., Schoehn, G., Foucaud-Gamen, J., Gout, E., Garcel, A., Drouet, E. and Chroboczek, J. (2003) Adenovirus dodecahedron allows large multimeric protein transduction in human cells. *J Virol.* **77**, 4960-4964
- 243 Vives, R. R., Lortat-Jacob, H., Chroboczek, J. and Fender, P. (2004) Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology.* **321**, 332-340
- 244 Fender, P., Schoehn, G., Perron-Sierra, F., Tucker, G. C. and Lortat-Jacob, H. (2008) Adenovirus dodecahedron cell attachment and entry are mediated by heparan sulfate and integrins and vary along the cell cycle. *Virology.* **371**, 155-164
- 245 Gout, E., Schoehn, G., Fenel, D., Lortat-Jacob, H. and Fender, P. (2010) The adenovirus type 3 dodecahedron's RGD loop comprises an HSPG binding site that influences integrin binding. *J Biomed Biotechnol.* **2010**, 541939
- 246 Friedl, P. and Gilmour, D. (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 445-457
- 247 Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **12**, 121-127
- 248 Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F. and Lortat-Jacob, H. (2004) Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem.* **279**, 43854-43860
- 249 Crown, S. E., Yu, Y., Sweeney, M. D., Leary, J. A. and Handel, T. M. (2006) Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding. *J Biol Chem.* **281**, 25438-25446
- 250 Springael, J. Y., Urizar, E. and Parmentier, M. (2005) Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 611-623
- 251 Martin, L., Blanpain, C., Garnier, P., Wittamer, V., Parmentier, M. and Vita, C. (2001) Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions. *Biochemistry.* **40**, 6303-6318
- 252 Proudfoot, A. E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. and Wells, T. N. (2001) The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem.* **276**, 10620-10626



- 253 Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Rousset, D., Clark-Lewis, I., Loetscher, P., Moser, B. and Baggiolini, M. (1996) HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature*. **383**, 400
- 254 Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. and Lusso, P. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. **270**, 1811-1815
- 255 Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. and Paxton, W. A. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. **381**, 667-673
- 256 Oravec, T., Pall, M., Wang, J., Roderiquez, G., Ditto, M. and Norcross, M. A. (1997) Regulation of anti-HIV-1 activity of RANTES by heparan sulfate proteoglycans. *J Immunol*. **159**, 4587-4592
- 257 Ylisastigui, L., Bakri, Y., Amzazi, S., Gluckman, J. C. and Benjouad, A. (2000) Soluble glycosaminoglycans Do not potentiate RANTES antiviral activity on the infection of primary macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. **278**, 412-422
- 258 Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S. and Luster, A. D. (1998) Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*. **391**, 908-911
- 259 Ylisastigui, L., Vizzavona, J., Drakopoulou, E., Paindavoine, P., Calvo, C. F., Parmentier, M., Gluckman, J. C., Vita, C. and Benjouad, A. (1998) Synthetic full-length and truncated RANTES inhibit HIV-1 infection of primary macrophages. *Aids*. **12**, 977-984
- 260 Lortat-Jacob, H., Turnbull, J. E. and Grimaud, J. A. (1995) Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate. *Biochem J*. **310** ( Pt 2), 497-505
- 261 Pye, D. A. and Gallagher, J. T. (1999) Monomer complexes of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate oligosaccharides are the minimal functional unit for cell activation. *J Biol Chem*. **274**, 13456-13461
- 262 Mulloy, B., Forster, M. J., Jones, C. and Davies, D. B. (1993) N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem J*. **293** ( Pt 3), 849-858
- 263 Wilken, J., Hoover, D., Thompson, D. A., Barlow, P. N., McSparron, H., Picard, L., Wlodawer, A., Lubkowski, J. and Kent, S. B. (1999) Total chemical synthesis and high-resolution crystal structure of the potent anti-HIV protein AOP-RANTES. *Chem Biol*. **6**, 43-51
- 264 Vives, R. R., Sadir, R., Imbert, A., Rencurosi, A. and Lortat-Jacob, H. (2002) A Kinetics and Modeling Study of RANTES(9-68) Binding to Heparin Reveals a Mechanism of Cooperative Oligomerization. *Biochemistry*. **41**, 14779-14789
- 265 Merry, C. L., Lyon, M., Deakin, J. A., Hopwood, J. J. and Gallagher, J. T. (1999) Highly sensitive sequencing of the sulfated domains of heparan sulfate. *J Biol Chem*. **274**, 18455-18462
- 266 Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. and Gallagher, J. T. (1999) A strategy for rapid sequencing of heparan sulfate and heparin saccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 2698-2703
- 267 Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. and Sasisekharan, R. (1999) Sequencing complex polysaccharides. *Science*. **286**, 537-542
- 268 Vives, R. R., Pye, D. A., Salmivirta, M., Hopwood, J. J., Lindahl, U. and Gallagher, J. T. (1999) Sequence analysis of heparan sulphate and heparin oligosaccharides. *Biochem J*. **339**, 767-773
- 269 Bielicki, J., Hopwood, J. J., Wilson, P. J. and Anson, D. S. (1993) Recombinant human iduronate-2-sulphatase: correction of mucopolysaccharidosis-type II fibroblasts and characterization of the purified enzyme. *Biochem J*. **289**, 241-246

- 270 Unger, E. G., Durrant, J., Anson, D. S. and Hopwood, J. J. (1994) Recombinant alpha-L-iduronidase: characterization of the purified enzyme and correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts. *Biochem J.* **304**, 43-49
- 271 Litjens, T., Bielicki, J., Anson, D. S., Friderici, K., Jones, M. Z. and Hopwood, J. J. (1997) Expression, purification and characterization of recombinant caprine N-acetylglucosamine-6-sulphatase. *Biochem J.* **327**, 89-94
- 272 Jemth, P., Kreuger, J., Kusche-Gullberg, M., Sturiale, L., Gimenez-Gallego, G. and Lindahl, U. (2002) Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs. Exploring the structural diversity by screening for FGF1 and FGF2 binding. *J Biol Chem.* **277**, 30567-30573
- 273 Kreuger, J., Jemth, P., Sanders-Lindberg, E., Eliahu, L., Ron, D., Basilico, C., Salmivirta, M. and Lindahl, U. (2005) Fibroblast growth factors share binding sites in heparan sulphate. *Biochem J.* **389**, 145-150
- 274 Casu, B., Petitou, M., Provasoli, M. and Sinay, P. (1988) Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. *Trends Biochem Sci.* **13**, 221-225
- 275 Vives, R. R., Goodger, S. and Pye, D. A. (2001) Combined strong anion-exchange HPLC and PAGE approach for the purification of heparan sulphate oligosaccharides. *Biochem J.* **354**, 141-147
- 276 Shaw, J. P., Johnson, Z., Borlat, F., Zwahlen, C., Kungl, A., Roulin, K., Harrenga, A., Wells, T. N. and Proudfoot, A. E. (2004) The X-Ray Structure of RANTES; Heparin-Derived Disaccharides Allows the Rational Design of Chemokine Inhibitors. *Structure (Camb).* **12**, 2081-2093
- 277 Blocker, A. J., Deane, J. E., Veenendaal, A. K., Roversi, P., Hodgkinson, J. L., Johnson, S. and Lea, S. M. (2008) What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 6507-6513
- 278 Cornelis, G. R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* **4**, 811-825
- 279 Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M. and Saier, M. H., Jr. (2003) Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P fluorescens*. *Biochim Biophys Acta.* **1611**, 223-233
- 280 Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J. and Attree, I. (2005) PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett.* **253**, 95-101
- 281 Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. and Attree, I. (2001) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol.* **40**, 76-85
- 282 Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V. and Attree, I. (2006) Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry.* **45**, 8117-8123
- 283 Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. and Dessen, A. (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.* **22**, 4957-4967
- 284 Faudry, E., Job, V., Dessen, A., Attree, I. and Forge, V. (2007) Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *FEBS J.* **274**, 3601-3610
- 285 Boyd, A. P., Sory, M. P., Iriarte, M. and Cornelis, G. R. (1998) Heparin interferes with translocation of Yop proteins into HeLa cells and binds to LcrG, a regulatory component of the *Yersinia* Yop apparatus. *Mol Microbiol.* **27**, 425-436
- 286 Guimond, S. E., Puvirajesinghe, T. M., Skidmore, M. A., Kalus, I., Dierks, T., Yates, E. A. and Turnbull, J. E. (2009) Rapid purification and high sensitivity analysis of heparan sulfate from cells and tissues: toward glycomics profiling. *J Biol Chem.* **284**, 25714-25722

- 287 Skidmore, M. A., Guimond, S. E., Dumax-Vorzet, A. F., Yates, E. A. and Turnbull, J. E. (2010) Disaccharide compositional analysis of heparan sulfate and heparin polysaccharides using UV or high-sensitivity fluorescence (BODIPY) detection. *Nat Protoc.* **5**, 1983-1992
- 288 Wasteson, A. (1971) A method for the determination of the molecular weight and molecular-weight distribution of chondroitin sulphate. *J Chromatogr.* **59**, 87-97
- 289 Viviano, B. L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J. and Saunders, S. (2004) Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J Biol Chem.* **279**, 5604-5611
- 290 Kuberan, B., Lech, M. Z., Beeler, D. L., Wu, Z. L. and Rosenberg, R. D. (2003) Enzymatic synthesis of antithrombin III-binding heparan sulfate pentasaccharide. *Nat Biotechnol.* **21**, 1343-1346
- 291 Lindahl, U., Li, J. P., Kusche-Gullberg, M., Salmivirta, M., Alaranta, S., Veromaa, T., Emeis, J., Roberts, I., Taylor, C., Oreste, P., Zopetti, G., Naggi, A., Torri, G. and Casu, B. (2005) Generation of "neoheparin" from *E. coli* K5 capsular polysaccharide. *J Med Chem.* **48**, 349-352
- 292 Arungundram, S., Al-Mafraji, K., Asong, J., Leach, F. E., 3rd, Amster, I. J., Venot, A., Turnbull, J. E. and Boons, G. J. (2009) Modular synthesis of heparan sulfate oligosaccharides for structure-activity relationship studies. *J Am Chem Soc.* **131**, 17394-17405
- 293 de Paz, J. L., Noti, C. and Seeberger, P. H. (2006) Microarrays of synthetic heparin oligosaccharides. *J Am Chem Soc.* **128**, 2766-2767
- 294 Lubineau, A., Lortat-Jacob, H., Gavard, O., Sarrazin, S. and Bonnaffe, D. (2004) Synthesis of tailor-made glycoconjugate mimetics of heparan sulfate that bind IFN-gamma in the nanomolar range. *Chemistry.* **10**, 4265-4282
- 295 Forster, M. and Mulloy, B. (2006) Computational approaches to the identification of heparin-binding sites on the surfaces of proteins. *Biochem Soc Trans.* **34**, 431-434
- 296 Imberty, A., Lortat-Jacob, H. and Perez, S. (2007) Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr Res.* **342**, 430-439
- 297 Rudd, T. R., Yates, E. A. and Hricovini, M. (2009) Spectroscopic and theoretical approaches for the determination of heparin saccharide structure and the study of protein-glycosaminoglycan complexes in solution. *Curr Med Chem.* **16**, 4750-4766
- 298 Ahl, I. M., Jonsson, B. H. and Tibell, L. A. (2009) Thermodynamic characterization of the interaction between the C-terminal domain of extracellular superoxide dismutase and heparin by isothermal titration calorimetry. *Biochemistry.* **48**, 9932-9940
- 299 Prabhakar, V., Capila, I. and Sasisekharan, R. (2009) Glycosaminoglycan characterization methodologies: probing biomolecular interactions. *Methods Mol Biol.* **534**, 331-340
- 300 Volpi, N. and Linhardt, R. J. (2010) High-performance liquid chromatography-mass spectrometry for mapping and sequencing glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Nat Protoc.* **5**, 993-1004
- 301 Marson, A., Robinson, D. E., Brookes, P. N., Mulloy, B., Wiles, M., Clark, S. J., Fielder, H. L., Collinson, L. J., Cain, S. A., Kielty, C. M., McArthur, S., Buttle, D. J., Short, R. D., Whittle, J. D. and Day, A. J. (2009) Development of a microtiter plate-based glycosaminoglycan array for the investigation of glycosaminoglycan-protein interactions. *Glycobiology.* **19**, 1537-1546
- 302 Mercey, E., Sadir, R., Maillart, E., Roget, A., Baleux, F., Lortat-Jacob, H. and Livache, T. (2008) Polypyrrole oligosaccharide array and surface plasmon resonance imaging for the measurement of glycosaminoglycan binding interactions. *Anal Chem.* **80**, 3476-3482

- 303 Adjou, K. T., Simoneau, S., Sales, N., Lamoury, F., Dormont, D., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Deslys, J. P. and Lasmezas, C. I. (2003) A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol.* **84**, 2595-2603
- 304 Barbier-Chassefiere, V., Garcia-Filipe, S., Yue, X. L., Kerros, M. E., Petit, E., Kern, P., Saffar, J. L., Papy-Garcia, D., Caruelle, J. P. and Barritault, D. (2009) Matrix therapy in regenerative medicine, a new approach to chronic wound healing. *J Biomed Mater Res A.* **90**, 641-647
- 305 Bartlett, A. H. and Park, P. W. (2010) Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med.* **12**, e5
- 306 Borsig, L. (2010) Heparin as an inhibitor of cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **93**, 335-349
- 307 Dai, E., Liu, L. Y., Wang, H., McIvor, D., Sun, Y. M., Macaulay, C., King, E., Munuswamy-Ramanujam, G., Bartee, M. Y., Williams, J., Davids, J., Charo, I., McFadden, G., Esko, J. D. and Lucas, A. R. (2010) Inhibition of chemokine-glycosaminoglycan interactions in donor tissue reduces mouse allograft vasculopathy and transplant rejection. *PLoS One.* **5**, e10510
- 308 Lever, R. and Page, C. P. (2002) Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov.* **1**, 140-148
- 309 Rienstra, H., Katta, K., Celie, J. W., van Goor, H., Navis, G., van den Born, J. and Hillebrands, J. L. (2010) Differential expression of proteoglycans in tissue remodeling and lymphangiogenesis after experimental renal transplantation in rats. *PLoS One.* **5**, e9095
- 310 Volpi, N. (2006) Therapeutic applications of glycosaminoglycans. *Curr Med Chem.* **13**, 1799-1810
- 311 Yamada, S. and Sugahara, K. (2008) Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Curr Drug Discov Technol.* **5**, 289-301
- 312 HajMohammadi, S., Enjyoji, K., Princiville, M., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., Rayburn, H., Schwartz, J. J., Barzegar, S., de Agostini, A. I., Post, M. J., Rosenberg, R. D. and Shworak, N. W. (2003) Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *J Clin Invest.* **111**, 989-999